



# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS**

**POSGRADO EN BIOCENCIAS**

---

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS  
FILOGENÉTICO MULTILOCUS (ITS, TEF Y RPB2)  
DEL COMPLEJO FÚNGICO ASOCIADO A  
PUDRICIÓN DE RAÍZ EN SANDÍA EN SONORA,  
MÉXICO.**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN BIOCENCIAS**

presenta:

**MARÍA EUGENIA RENTERÍA MARTÍNEZ**

**Hermosillo, Sonora, México**

**21 de febrero de 2019**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **DERECHOS DE AUTOR**

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

---

**María Eugenia Rentería Martínez**

Autor

---

**Dra. Nohemí Gámez Meza**

Coordinadora del Programa de Doctorado en Biociencias

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO MULTILOCUS  
(*ITS*, *TEF* Y *RPB2*) DEL COMPLEJO FÚNGICO ASOCIADO A PUDRICIÓN DE RAÍZ EN  
SANDÍA EN SONORA, MÉXICO

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOCENCIAS

Presenta:


MARÍA EUGENIA RENTERÍA MARTÍNEZ

Hermosillo, Sonora, México.

Febrero 2019.

## APROBACIÓN


Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Caracterización morfológica y análisis filogenético multilocus (*ITS*, *TEF* y *RPB2*) del complejo fúngico asociado a pudrición de raíz en sandía en Sonora, México” presentada por María Eugenia Rentería Martínez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



---

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán


Director



---

Dr. Sergio Francisco Moreno Salazar

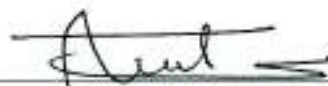
Co-director



---

Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

Sinodal



---

Dra. Ma. Guadalupe Burboa Zazueta

Sinodal



---

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna

Sinodal

## DEDICATORIA

Con amor y respeto,

a mis primeros maestros Eusebio y María Eugenia

Con mucho cariño,

para mis hermanos Aída, Ada Luz, Hiram Fabricio, Omar Fabio, Elia Ruth y Jairo

Para mis amados hijos, de quienes todos los días aprendo algo nuevo

Iván, Luciana, Elena y María Eugenia

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora, al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, al Departamento de Agricultura y Ganadería y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme las facilidades para realizar mis estudios de Doctorado.

A mi director de Tesis, el Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, por permitirme realizar mi investigación con gran independencia.

A mi Co-director, el Dr. Sergio Francisco Moreno Salazar, por su infinita paciencia, asesoramiento y orientación crítica y oportuna a lo largo de este trabajo.

A mi comité de Tesis, por su valiosa contribución a mi formación académica.

Al Ing. Miguel Guerra Camacho, sin tu colaboración y dedicación no lo hubiera logrado.

Al Ing. Juan Manuel Guzmán Ortiz. Gracias a su valioso apoyo técnico en esta y otras investigaciones han podido fluir sin más contratiempo.

A la Dra. Amparo del Carmen Meza Möller por introducirme al mundo de la Fitopatología y por su amistad incondicional.

Al Dr. Alejandro Varela Romero por compartir conmigo clara y generosamente sus conocimientos sobre Filogenética.

A la Dra. Josefina Ramos Paredes, que desinteresadamente me mostró como, sin realizar la fotosíntesis, pueden producirse árboles fácilmente.

## RESUMEN

La pudrición radicular es uno de los principales problemas fitosanitarios que se presenta en sandía cultivada en Sonora, el principal productor en México. La presente tesis se planteó con la finalidad de identificar mediante análisis morfológico y filogenético a especies fúngicas asociadas a la pudrición de raíz en el cultivo de sandía en cuatro campos ubicados en la Costa de Hermosillo y Valle de Guaymas. Durante el ciclo primavera-verano 2013 y 2014 se observó pudrición de raíz, marchitez, colapso y muerte de guías de sandía. Se aislaron 45 cepas puras de hongos que en base a la comparación de estructuras con claves taxonómicas fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Las reacciones de amplificación de ADN por PCR y el análisis filogenético por Máxima Verosimilitud de las secuencias concatenadas (*ITS*, *TEF* y *RPB2*), permitieron la agrupación de los aislados en 7 clados. Tres clados identificaron a *Fusarium falciforme* (*Fusarium solani* species complex), *F. brachygibbosum* (*Fusarium sambucinum* species complex) y *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum* species complex); dos clados correspondieron a los grupos anastomóticos AG-A y AG-F de *Ceratobasidium* sp., y otros dos a AG-4 y AG-6 de *Rhizoctonia solani*. Se describieron cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* y se compararon con los de *F. falciforme* y *F. oxysporum*, lo que permitirá mejorar el diagnóstico morfológico de la enfermedad. Finalmente, se desarrollaron protocolos de PCR múltiple y qPCR para la identificación y cuantificación en menos de tres horas para cada ensayo de las especies fúngicas del género *Fusarium*. Las pruebas de patogenicidad realizadas con aislados representativos de cada especie demostraron que la pudrición radicular y marchitez de plantas de sandía puede ser causada, de manera individual o en conjunto, por un grupo diverso de hongos. La información generada servirá de base para implementar el manejo integrado de la enfermedad.



## ABSTRACT

Root rot is one of the main phytosanitary problems that occur in watermelon cultivated in Sonora, the main producer in Mexico. The present thesis was proposed with the purpose of identifying by morphological and phylogenetic analysis the fungal species associated with root rot in watermelon cultivation in four fields located in the Coast of Hermosillo and Valle de Guaymas. During the spring-summer 2013 and 2014 cycle, root rot, wilting, collapse and death of watermelon guides were observed. We isolated 45 pure strains of fungi that based on the comparison of their structures with taxonomic keys were identified as belonging to the genera *Fusarium* and *Rhizoctonia*. The amplification reactions of DNA by PCR and the phylogenetic analysis by Maximum Likelihood of the concatenated sequences (*ITS*, *TEF* and *RPB2*) allowed the grouping of the isolates in 7 clades. Three clades were identified as *F. falciforme* (*Fusarium solani* species complex), *F. brachygibbosum* (*Fusarium sambucinum* species complex) and *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum* species complex); two clades corresponded to the anastomatic groups AG-A and AG-F of *Ceratobasidium* sp., and two to AG-4 and AG-6 of *Rhizoctonia solani*. Four morphotypes of *F. brachygibbosum* were described and compared with those of *F. falciforme* and *F. oxysporum*, which will improve the morphological diagnosis of the disease. At the same time, protocols of multiple PCR and qPCR were developed for the identification and quantification of the fungal species of the genus *Fusarium* in less than three hours each assay. The pathogenicity tests performed with representative isolates of each species showed that the root rot and wilting of watermelon plants can be caused, individually or together, by a diverse group of fungi. The information generated will serve as a basis to implement the integrated management of the disease.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
APROBACIÓN .....	<i>i</i>
DEDICATORIA .....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS .....	<i>iii</i>
RESUMEN .....	<i>iv</i>
ABSTRACT .....	<i>v</i>
ÍNDICE DE TABLAS .....	<i>vii</i>
INTRODUCCIÓN .....	1
I. ANTECEDENTES .....	2
I.1. Hongos fitopatógenos causantes de pudrición radicular en sandía .....	7
I.1.1. <i>Fusarium</i> spp .....	8
I.1.2. <i>Rhizoctonia</i> spp .....	10
I.2. Diagnóstico de enfermedades causadas por hongos en plantas.....	11
I.3. Métodos tradicionales para la identificación de patógenos fúngicos en plantas .....	12
I.4. Métodos basados en los ácidos nucleicos para la identificación de patógenos fúngicos en plantas .....	13
I.5. Filogenia multilocus de hongos fitopatógenos. ....	14
II. JUSTIFICACIÓN .....	15
III. OBJETIVOS .....	16
III.1. Objetivo general .....	16
III.2. Objetivos específicos .....	16
IV. RESULTADOS .....	17
V. DISCUSIONES .....	96
VI. CONCLUSIONES .....	100
VII. RECOMENDACIONES .....	101
VIII. LITERATURA CITADA .....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Producción estatal de sandía durante el ciclo OI. Serie histórica 2008-2018	3
2	Producción estatal de sandía durante el ciclo PV. Serie histórica 2008-2018	4
3	Datos sobre la producción de sandía en Sonora en 2018, totales y por distrito de Desarrollo Rural.	6
4	Relación de artículos científicos en cumplimiento a los objetivos particulares.	17

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) genera alrededor de 300 millones de USD anuales en México. Sonora es su principal productor, en 2017 la producción de sandía redituó más de 30 millones de USD de utilidad en dicho estado. No obstante, algunos factores como: la falta de rotación en los cultivos y los inadecuados planes de manejo de plagas y enfermedades en las zonas productoras de la región, han permitido el arraigo de diversos patógenos en las principales zonas productoras.

En Sonora, la marchitez y muerte de plantas de sandía por pudrición de raíz ha sido asociada principalmente a *Fusarium oxysporum*; sin embargo, a nivel mundial se ha reportado que *Fusarium solani* y a *Rhizoctonia solani* también son capaces de causar dicha enfermedad.

Con base en lo anterior, con el fin de determinar con precisión cuáles son las especies de hongos fitopatógenos causantes de pudrición radicular en el cultivo de sandía en Sonora, en el presente trabajo se planteó la identificación morfológica y molecular de aislados provenientes de plantas sintomáticas del Valle de Guaymas y la Costa de Hermosillo, los principales productores del fruto en el estado. Adicionalmente, se propone realizar una descripción detallada de las características macroscópicas y microscópicas distintivas de las diferentes especies responsables de daño radicular, con el fin de contribuir a las metodologías tradicionales de identificación y desarrollar protocolos para una rápida identificación y cuantificación de los hongos fitopatógenos mediante PCR múltiple y qPCR cuantitativa.

## I. ANTECEDENTES

El cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) está entre los de mayor importancia en el mundo ya que se estima que alrededor del 6% del área cultivable total se dedica a la producción de esta cucurbitácea (<http://faostat.fao.org>, 2016). Es una de las frutas más importantes en el comercio agroalimentario de México y hoy ocupa el primer lugar en las exportaciones en el mundo, a las que se destina, en promedio, 33.6 por ciento de la producción. Además de la generación de divisas, este cultivo es social y económicamente significativo porque es una fuente importante de empleo, ya que su proceso demanda de forma intensiva la mano de obra (García-Vázquez *et al.*, 2011).

Los datos del Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ([http://www.siap.gob.mx/.](http://www.siap.gob.mx/)) indican que en 2018 se sembraron casi 277 mil hectáreas de sandía en México y se cosecharon más de diez millones de toneladas. La situación geográfica del país y el uso de tecnologías diferentes permiten su cultivo en 29 estados en todos los ciclos agrícolas y modalidades hídricas. En 2008, 61.5 por ciento de la producción se obtuvo en el ciclo otoño-invierno (OI) y el restante 38.5 en el de primavera-verano (PV). Así mismo, 70.1 por ciento fue de riego y 29.9 de temporal.

En Sonora, la superficie de sandía cosechada por año casi se ha duplicado en 10 años, ya que ha pasado de 6 509 ha en 2008, a 10 245.4 ha en 2018, mientras que el valor comercial se ha quintuplicado durante el mismo lapso de tiempo; lo que ubica al estado como el primer productor de sandía en México, con 37.6% de la producción nacional (SNIDRUS-SAGARPA). El valor de la producción llegó a sus niveles más altos en 2018, con 2 043 132 000 pesos generados por 477 612.65 ton de producto (Tablas 1 y 2). La producción ha venido mejorando con rendimientos promedios regionales en siembras de primavera de 70 toneladas por hectárea y de 40 toneladas por hectárea en la siembra de verano gracias al manejo agroquímico de plagas, tecnificación del riego, uso de porta injertos, uso de variedades adaptadas al clima de la región. Las dos épocas de siembra le permiten al agricultor incursionar tanto en el mercado de

exportación como en el nacional, lográndose un beneficio social y económico por la generación de empleos y la derrama económica (Sabori *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Producción estatal de sandía durante el ciclo OI. Serie histórica 2008-2018.

Otoño-Invierno	Superficie en hectáreas		Producción Obtenida	Valor de la Producción
Año	Sembrada	Cosechada	(Ton)	(Miles de \$)
2008	2,153.00	2,113.00	80,998.00	83,072.55
2009	1,681.00	1,681.00	61,340.00	75,320.00
2010	3,110.00	3,110.00	108,690.00	177,521.00
2011	2,723.00	1,953.00	67,133.56	94,788.86
2012	2,736.00	2,736.00	96,757.58	202,025.35
2013	2,327.00	2,271.00	85,413.80	199,152.31
2014	3,061.00	3,061.00	112,597.21	247,795.59
2015	3,443.00	3,443.00	132,833.45	336,079.72
2016	4,081.00	4,079.00	193,708.02	585,367.52
2017	5,523.00	5,523.00	254,166.37	895,394.66
2018	4,729.20	4,729.20	232,307.65	854,951.09

<http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/datosagp/concultivosxano.asp>

**Tabla 2.** Producción estatal de sandía durante el ciclo PV. Serie histórica 2008-2018.

Primavera verano	Superficie en hectáreas		Producción Obtenida	Valor de la Producción	
	Año	Sembrada	Cosechada	(Ton)	(Miles de \$)
	2008	4,398.00	4,396.00	159,527.43	321,876.15
	2009	3,445.50	3,438.25	134,078.00	266,203.00
	2010	3,513.00	3,513.00	134,583.00	265,861.70
	2011	3,973.00	3,836.00	115,865.70	278,456.93
	2012	4,462.00	4,462.00	153,492.70	267,414.11
	2013	4,629.00	4,629.00	152,900.60	340,168.84
	2014	3,962.00	3,950.00	136,766.50	351,454.61
	2015	3,893.00	3,893.00	158,718.00	347,571.00
	2016	5,046.00	4,951.00	246,398.00	771,638.08
	2017	5,248.50	5,248.50	233,927.88	816,601.24
	2018	7,802.40	5,516.40	245,305.00	1,188,231.16

<http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/datosagp/concultivosxano.asp>

Como se muestra en la Tabla 3, los municipios de Hermosillo y Guaymas son los principales productores de sandía en Sonora, concentrando el más del 90% de la superficie destinada a este cultivo, realizado en dos ciclos, PV y OI (SAGARHPA-Sonora, 2019). Ambas regiones tienen condiciones climáticas similares: de 50 a 300 mm de precipitación media anual y clima cálido a semicálido.

La sandía es una planta anual herbácea, de porte rastrero o trepador, con sistema radicular muy ramificado, raíz principal profunda y raíces secundarias distribuidas superficialmente. El tallo es rastrero. Es un cultivo que requiere un subsoleo para facilitar el desarrollo de las raíces seguido de un barbecho profundo. Para desmenuzar los terrones con un rastreo cruzado es suficiente y posteriormente nivelar y trazar las camas, todas estas prácticas proporcionan un medio adecuado para el desarrollo de las raíces y absorción del agua, además si se va a hacer uso de la plasticultura, el suelo debe de estar bien mullido para facilitar la colocación del acolchado (Sabori *et al.*, 2015).

Actualmente, las variedades que se siembran son las determinadas por el principal mercado, los Estados Unidos. Esto hace que alrededor del 80 % de la sandía cultivada en el estado sean variedades sin semilla o triploides, de forma redonda, con peso de 6 a 10 kg o variedades de sandías personales. Para el mercado nacional se eligen variedades con semillas, de forma ovalada y de 8 a 16 kg por fruto (Ing. Horacio Agramón Ochoa, com. pers.).

Debido al alto costo de la semilla híbrida y su bajo porcentaje de germinación y requerimientos críticos de humedad y temperatura, se recomienda trasplantar y evitar la siembra directa; es necesario sembrar en forma alternada una variedad de sandía con semilla como polinizador (fruto sin valor comercial) y se recomienda plantar con una frecuencia de plantación de 2-3:1, es decir dos a tres plantas del triploide por una del polinizador. Las sandías triploides deben cosecharse con una madurez óptima puesto que no continúan madurando después del corte, como sucede con las sandías con semilla. Se debe tratar de cosechar durante los periodos más frescos del día para mantener la calidad y vida de anaquel del fruto (Sabori *et al.*, 2015).

Otro criterio para seleccionar la variedad de sandía a sembrar es la resistencia a enfermedades. Las enfermedades más comunes en sandía cultivada bajo un sistema de producción intensivo y continuo, que utiliza semilla híbrida son las transmitidas por hongos del suelo. Las pérdidas en las cosechas dependen de la concentración de inóculo, el cultivar, el ambiente y la interacción planta-patógeno (Krikun *et al.*, 1982).



**Tabla 3.** Datos sobre la producción de sandía en Sonora en 2018, totales y por distrito de Desarrollo Rural.

<u>Otoño-Invierno</u>	Superficie en hectáreas		Producción	Valor de la
	Sembrada	Cosechada	Obtenida	Producción
Distritos de Desarrollo Rural			(Ton)	(Miles de \$)
Hermosillo	1,977.00	1,977.00	104,740.00	509,019.50
Guaymas	1,970.50	1,970.50	90,561.75	210,733.18
Cajeme	649.00	649.00	31,963.30	114,975.07
Navojoa	132.70	132.70	5,042.60	20,223.35
Subtotal	4,729.20	4,729.20	232,307.65	854,951.09
<u>Primavera-Verano</u>				
Caborca	75.00	75.00	2,275.00	12,464.74
Agua prieta	110.00	110.00	3,500.00	10,098.20
Hermosillo	6,350.00	4,363.00	192,845.00	1,035,364.92
Guaymas	1,079.00	780.00	37,265.00	106,753.30
San Luis Río Colorado	188.40	188.40	9,420.00	23,550.00
Subtotal	7,802.40	5,516.40	245,305.00	1,188,231.16
<b>TOTAL</b>	<b>12,531.60</b>	<b>10,245.60</b>	<b>477,612.65</b>	<b>2,043,182.25</b>

Fuente: <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/datosagp/concultivosoi.asp>

Hasta el 2018, no existían publicaciones arbitradas con información acerca de las especies causantes de pudrición radicular en sandía en Sonora y mucho menos hay trabajos publicados acerca de la cuantificación de los niveles de infestación en las zonas de producción. Para evadir los problemas fúngicos presentados en la raíz, los principales productores de sandía en Sonora han adoptado técnicas como el injerto de plantas de sandía sobre portainjertos de calabaza (López-Elías *et al.*, 2010). La resistencia de estas plantas a múltiples enfermedades provee al agricultor de una estrategia viable y una alternativa a la rotación de cultivos y a la fumigación con bromuro de metilo, prohibido actualmente (Bulathsinghala y Shaw, 2014). Sin embargo, el precio de la plántula injertada oscila entre 12 y 16 pesos por pieza, dependiendo de la variedad y del volumen de compra, en comparación con 6 a 8 pesos de las plántulas sin injertar. La inversión necesaria para implementar esta tecnología ocasiona que sea inaccesible para muchos

productores. Además, es indispensable el tratamiento químico con al menos dos fungicidas para prevenir patógenos foliares (Ing. Horacio Agramón Ochoa, com. pers.).

Por otro lado, la resistencia genética que ofrecen las productoras de semillas es principalmente a marchitez por *Fusarium* y a algunos virus. Las compañías han basado sus programas de mejoramiento genético en *F. oxysporum*, sin mucho éxito, ya que regularmente se presenta en campo en las etapas tardías de la producción cuando la mayoría de los costos se ha ejercido, por lo que no se invierte más en el cultivo y éste es abandonado (Ing. Leonel Ibarra Chaparro, com. pers.). Se ha especulado que la carencia de resistencia a un amplio rango de enfermedades en cultivares de sandía modernos es el resultado de muchos años de cultivo y selección que se han enfocado en características deseables en los frutos a expensas de la resistencia a enfermedades (Levi *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2009).

De igual forma debe considerarse que plantas como la sandía, son cultivos que requieren alta humedad en el suelo. Con frecuencia se desconocen los requerimientos de agua óptimos para no comprometer el rendimiento, por lo que estos niveles se mantienen por arriba de la capacidad de campo. Lo anterior contribuye a crear las condiciones idóneas para el desarrollo de hongos transmitidos por el suelo. La humedad relativa óptima para la sandía se sitúa entre el 60 y el 80 %, siendo un factor determinante para la floración. La sandía no es muy exigente en suelos, aunque le va bien en suelos bien drenados ricos en materia orgánica y fértil.

### **1.1. Hongos fitopatógenos causantes de pudrición radicular en sandía.**

A nivel mundial, diversos hongos causantes de pérdidas económicas debido a la muerte de plantas de sandía han sido reportados en las últimas décadas. Los síntomas inician con amarillamiento foliar seguido de un colapso gradual de guías, generalmente justo antes de la cosecha. En la zona radicular se observa necrosis de raíces principales y secundarias. Estos síntomas por lo regular son ocasionados por *Monosporascus cannonballus*, *Acremonium cucurbitacearum*, *Plectosporium tabacinum* y *Rhizopycnis vagum*. Adicionalmente, otras especies asociadas con esta enfermedad son: *Pyrenochaeta lycopersici*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., y *Verticillium dahliae* (Chilosi *et al.*, 2008; Infantino *et al.*, 2004; Aiello *et al.*, 2012).

En la costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas en Sonora, la producción de sandía se ha visto limitada por la presencia de *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* (Ing. Jesús Ávila Salazar, com. pers., M. S. Sergio Garza Ortega, com. pers., Fernández *et al.*, 2013).

### **I.1.1 *Fusarium* spp.**

Las especies de hongos filamentosos dentro del género *Fusarium*, forman parte de la familia *Nectriaceae* perteneciente al orden *Hypocreales* de la clase *Sordariomycetes*. Son de gran impacto económico debido a que sus miembros están implicados en la salud humana, animal y vegetal, ya que producen un amplio rango de metabolitos secundarios que son peligrosos en los productos agrícolas y ganaderos, en la vida silvestre y en humanos. *Fusarium* es un grupo muy diverso que incluye especies saprobias, patogénicas y especies productoras de toxinas. Algunas especies dentro de este grupo son responsables de pudrición radicular y marchitez vascular en muchas especies vegetales económicamente importantes (Nelson *et al.*, 1994).

### **Complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC)**

FOSC comprende diferentes *formae speciales* (f.sp.) que infectan más de 100 diferentes hospederos provocando severos daños en cultivos como sandía, melón, tomate, algodón y plátano. Los miembros de FOSC colectivamente representan el complejo de especies más encontrado y económicamente importante. A nivel mundial se considera que la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* es la principal limitante para la producción de sandía (Zhou *et al.*, 2003). La enfermedad es conocida como colapso o declive de las guías maduras de la planta (marchitez repentina de sandía). De manera conjunta, las plantas también pueden estar infectadas con *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Monosporascus cannonballus* y *Pythium* spp., además de *F. oxysporum* (Boughalleb y El Mahjoub, 2006).

Debido a las pérdidas económicas generadas mundialmente por los miembros de FOSC, existe bastante literatura sobre la caracterización genética y patogénica de *formae speciales* individuales dentro de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y están definidas en base a la patogenicidad de uno o más hospederos vegetales, mientras que los VCG están definidas en

base a su habilidad para la anastomosis y para formar heterocariontes (Gordon y Martyn, 1997). Los VCG son excelentes predictores del origen evolucionario (Elias *et al.*, 1993) y parecen ser predominantemente linajes clonados. Algunas *formae speciales* se dividen en razas debido a la virulencia mostrada en un grupo de cultivares de una o más especies vegetales. Dado el alto nivel de diversidad filogenética y el gran número de *formae speciales*, la tipificación de secuencias de ADN multilocus (MLST) es actualmente la técnica más robusta para caracterizar la diversidad genética de FOOSC (Taylor y Fisher 2003)

### **Complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC)**

Los miembros del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) son saprófitos comunes, aislados frecuentemente de suelo, aire y plantas. Estos hongos son bien conocidos como patógenos de vegetales, animales y humanos, son causantes de dos terceras partes de la fusariosis en humanos y animales alrededor del mundo (Zhang *et al.*, 2004). Al menos 60 diferentes especies filogenéticamente distintas están incluidas en este complejo y debido a la alta especificidad al hospedero, han sido subdivididas en *formae speciales*. Análisis filogenéticos recientes han revelado que cada *forma specialis* corresponde a una especie, biológica y filogenéticamente distinta (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998). *F. falciforme* ha sido reportado sólo recientemente como agente causal de marchitamiento y pudrición de raíz en frijol lima y garbanzo en Brasil (Sousa *et al.*, 2017, Cabral *et al.*, 2016).

### **Complejo de especies *Fusarium sambucinum* (FSAMSC)**

El complejo de especies *Fusarium sambucinum* incluye al menos 35 individuos que incluyen a *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* y *F. brachygibbosum*, entre otras. Este último es agente causal de podredumbre del tallo del maíz (Shan *et al.*, 2017), marchitez y muerte regresiva en *Euphorbia larica* y olivo (Al-Mahmooli *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2017) y de podredumbre y canchros en almendro y nogal (Stack *et al.*, 2017; Marek *et al.*, 2013).

### **I.1.2 *Rhizoctonia* spp.**

*Rhizoctonia* spp. son un grupo diverso de teleomorfos ubicados en diferentes familias, órdenes y clases. *Rhizoctonia* fue descrito inicialmente por su habilidad de infectar plantas y formar esclerosios (Stalpers y Andersen 1996). Sin embargo, estos hongos también pueden crecer como saprobios o como simbiontes micorrícicos benéficos en orquídeas (Masuhara *et al.*, 1993; Cubeta y Vilgalys 2000; Jiang *et al.*, 2015). Tienen una distribución cosmopolita. Son plurívoros, comúnmente tienen como sustrato raíces, tallos, hojas y frutos de más de 500 especies vegetales (Farr y Rossman 2019).

Por la amplia variación en cuanto a localización geográfica, morfología, especificidad a hospedera y patogenicidad de subpoblaciones genéticamente diferentes, estos hongos forman un complejo de especies (Vilgalys y Cubeta 1994). *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium* representan a los géneros más estudiados debido a su importancia económica como patógenos de plantas y ambos forman un clado monofilico perteneciente a la familia *Ceratobasidiaceae* (González *et al.*, 2016).

*Rhizoctonia solani* y otras *Rhizoctonia* spp. no producen esporas asexuales, por lo que las características morfológicas de las células vegetativas (hifas y esclerocios), tales como la presencia o ausencia de septos, patrones de ramificación y constricción, número de núcleos por célula, pigmentación y ancho de las hifas fueron utilizadas para clasificarlos e identificarlos (Prillieux y Delacroix 1891). Posteriormente, cuando se descubrió que este hongo podría llevar a cabo la reproducción sexual (Rolfs 1903), el color, la forma y el tamaño de las estructuras sexuales también fueron utilizados como caracteres taxonómicos. Además, también se estableció una relación entre las etapas del anamorfo (asexual) y del teleomorfo (sexual). Sin embargo, los caracteres morfológicos de anamorfos y teleomorfos son variables y de valor limitado para definir y delimitar especies (Andersen y Stalpers 1994; Vilgalys y Cubeta 1994; Roberts 1999).

*Rhizoctonia solani* es la especie más reconocida de este complejo. Causa enfermedades en más de 200 plantas incluyendo a arroz, maíz, trigo, soya, papa, algodón, frutas, arboles, pastos y ornamentales. El modo de patogenicidad es parasitismo necrotrófico, una invasión no

específica de los tejidos de las plantas donde la hospedera muere a medida que es gradualmente consumida.

El criterio más importante para delimitar las especies de *Rhizoctonia* es el concepto de grupos anastomóticos. Este se basa en la premisa de que las hifas de aislados relacionados de las mismas especies (independientemente de la capacidad para aparearse) tienen la habilidad para reconocerse y fusionarse entre sí. Existen al menos 13 grupos anastomóticos en el género *Thanatephorus* (*Rhizoctonia* polinucleada con 3 a 21 núcleos) de AG-1 a AG-13 y 21 grupos en *Ceratobasidium* (*Rhizoctonia* binucleada) de AG-A a AG-U (Sharon *et al.*, 2008). La agresividad entre los diferentes grupos anastomóticos es variable (Erper *et al.*, 2016; Mathew *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014).

Mediante la reconstrucción filogenética usando fragmentos de secuencias de ADN de: dos genes codificantes nucleares (RPB2 y TEF1), un gen codificante mitocondrial (ATP6) y dos del operón del ADN ribosomal, el espaciador transcrito interno y la subunidad más grande del ribosoma (ITS y LSU), se ha comprobado la monofilia de *Ceratobasidiaceae* y que los clados dentro de esta familia son consistentes con la separación previa basada en criterios de anastomosis (González *et al.*, 2016).

*Ceratobasidium* spp. ha sido reportado como causante de pudrición y muerte de manzanos (Mazzola 1997), damping off en plántulas de tabaco (Mazuka 1998), tizón foliar en pinos (Putnam 1999), pudrición del hipocotilo en canola (Khangura *et al.*, 1999), pudrición negra en raíz de fresa (Martin 2000), pudrición de raíz y tallo en rosa (Priyatmojo *et al.*, 2001), pudrición del pedúnculo en maíz (Lovell *et al.*, 2003), damping off en acelga (Yang *et al.*, 2007), pudrición de raíz en sandía (Meza *et al.*, 2014), etc.

## **I.2. Diagnóstico de enfermedades causadas por hongos en plantas.**

El diagnóstico de las enfermedades en las plantas ha cambiado a lo largo de los años. Las técnicas aplicadas se engloban en tres categorías: tradicionales, serológicas y ácidos nucleicos. En el presente trabajo se emplean sólo técnicas tradicionales y de ácidos nucleicos, pero todas contribuyen al diagnóstico y control efectivo de la enfermedad y conducen a la adecuada intervención química y/o biológica.

### **I.3. Métodos tradicionales para la identificación de patógenos fúngicos en plantas.**

Los métodos tradicionales incluyen el uso de plantas indicadoras para producir síntomas visuales de la enfermedad en plantas susceptibles y el uso de medios sintéticos para favorecer el crecimiento de microorganismos que pueden ser identificados por la morfología de las colonias, mediante la descripción de los detalles y características de crecimiento, color del micelio, pigmentos en el agar y tipo de crecimiento. Microscópicamente, es posible la diferenciación hasta nivel de género y en ocasiones hasta especie cuando es posible la observación de elementos vegetativos de resistencia como esclerocios y clamidosporas o de nutrición como haustorios o de sostén o de fijación como las fiálides y conidióforos; de estructuras de fructificación sexuales como basidiosporas, oosporas, zigosporas o de estructuras fructificaciones asexuales como conidias (Agrios, 2011). Sin embargo, los caracteres morfológicos usados anteriormente en taxonomía, no permiten muchas veces la discriminación entre especies. En algunos casos, es complicado hasta para el fitopatólogo más entrenado debido a las similitudes que estas estructuras presentan.

Un ejemplo de la dificultad en la identificación morfológica es el género *Fusarium*. Muchas especies de *Fusarium* identificadas por medio de caracteres morfológicos son en realidad complejos de especies, con poca o ninguna diferencia en su morfología. Basado en las características morfológicas y en la tipificación de secuencias multilocus, el género *Fusarium* ha sido clasificado en varios complejos de especies como el complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC), complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) y el complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Con menos frecuencia son encontrados los miembros de los complejos de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Fusarium dimerum* (FDSC) y *Fusarium chlamydosporium* (FCSC), *Fusarium sambucinum* (FSAMSC) (Nelson *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 2007, 2008, 2009).

Por otra parte, las especies pertenecientes al género *Rhizoctonia* y similares, no producen esporas asexuales, por lo que se utilizan características morfológicas de células vegetativas, como hifas y esclerocios, para identificarlas y clasificarlas, tales como patrones de ramificación y constricción, número de núcleos por célula, pigmentación, grosor de las hifas. Para el caso de las formas sexuales se utilizan la forma, el color y el tamaño de los cuerpos fructificantes. Algunos hongos resupinados como es el caso del género *Ceratobasidium*, están relacionados al

anamorfo *Rhizoctonia*; sin embargo, los caracteres morfológicos del anamorfo y teleomorfo son variables y de valor limitado para definir especies (Andersen y Stalpers 1994; Roberts 1999; Vilgalys y Cubeta 1994).

#### **I.4. Métodos basados en los ácidos nucleicos para la identificación de patógenos fúngicos en plantas.**

En años recientes, el uso de métodos moleculares en la identificación y diagnóstico de hongos fitopatógenos se ha incrementado con el fin de resolver los problemas asociados a los sistemas de identificación morfológica. Estas técnicas están basadas en que los fragmentos de algún ácido nucleico dentro del genoma son únicos para cada individuo y pueden indicar su presencia. Una de las técnicas más empleadas es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que permite la rápida detección e identificación de patógenos sin las desventajas de los métodos clásicos. Una variante avanzada de esta técnica es la PCR en tiempo real, que puede medir el nivel de fluorescencia a medida que un colorante fluorescente se intercala en la doble hebra de ADN.

El primer paso para el desarrollo exitoso de cualquier ensayo de PCR tiempo real es el diseño de primers para la amplificación específica del ADN del patógeno objetivo y de un control interno, que generalmente es un gen endógeno o constitutivo, que no muestra variación entre los aislados. El segundo paso es seleccionar la química, lo cual depende del diseño del experimento. Los principales químicos fluorescentes son las sondas Taqman, el compuesto SYBR green y las balizas moleculares. Las sondas Taqman son más caras que el SYBR green; sin embargo, la sensibilidad es mayor. La validación de los ensayos puede hacerse con cepas de referencia, genéticamente cercanas al aislado relacionado y al ADN del hospedero. Para la cuantificación de patógenos en suelo o planta, se requiere de ADN de concentración conocida para la construcción de una curva estándar. Zhang *et al.* (2005), identificaron exitosamente con sondas Taqman a *Fusarium oxysporum* niveum y *Mycosphaerella melonis* en plantas inoculadas artificialmente al quinto día de la inoculación, aun cuando las plantas permanecieron asintomáticas hasta el día 13. La rápida detección del patógeno ayuda a los agricultores a decidir sobre estrategias de prevención y control de la diseminación de la enfermedad. Además, la PCR tiempo real se usa también para detectar patógenos directamente del suelo.



## **I.5. Filogenia multilocus de hongos fitopatógenos.**

Actualmente existe un enfoque filogenético para reconocer a las especies fúngicas que causan enfermedades en plantas basado en la concordancia de genealogías de diversos genes debido al pleomorfismo que presentan la mayoría de los hongos (Taylor *et al.*, 2000).

El pleomorfismo o diversidad de propágulos fúngicos, es una característica observada en Ascomicetos y Basidiomicetos, tales como *Fusarium* y *Rhizoctonia*. En el pasado, los hongos Ascomicetos se clasificaban principalmente en base a sus esporas y se les dio un nombre separado a las estructuras sexuales (teleomorfo) y a las estructuras asexuales (anamorfo), o si existían varias formas asexuales (sinanamorfos). Todas juntas representan al holomorfo. Este sistema de nomenclatura dual puede ser confusa para los fitopatólogos y, en muchas ocasiones, conduce a un manejo errático y poco preciso de fungicidas (Crous *et al.*, 2015).

Adicionalmente a lo anterior, en algunos géneros de hongos fitopatógenos, los nombres enmascaran la variación en la especificidad al hospedero y la patogenicidad que existe por debajo del nivel de especie. Tal variación puede representar especies crípticas. Debido a esto, desde 2011, se ha propuesto el fin de la nomenclatura dual y el uso de un único nombre para cada especie. La fusión de nombres genéricos de especies sexuales y asexuales es actualmente procesada por grupos de trabajo bajo la tutela del ICTF (International Commission on the Taxonomy of Fungi), incluyendo un nuevo comité para nombres de hongos fitopatógenos (<http://www.fungaltaxonomy.org>).

A través de la representación gráfica de árboles filogenéticos que plasman el estudio de las relaciones evolutivas usando ADN, ha quedado demostrado que muchas especies de hongos fitopatógenos pertenecen a complejos de especies o que están incluidos en géneros polifiléticos o parafiléticos. La resolución de estos conceptos de género y especie es de vital importancia para la sanidad vegetal y para el mercado global de alimentos y fibras (Crous *et al.*, 2016).

## II. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas en la producción de sandía en el estado de Sonora debido a la muerte de plantas causadas por hongos en algunos campos alcanzan el 100%. Esto representa considerables pérdidas económicas para el sector dados los niveles de producción estatal y el alto valor económico del fruto. Entre las especies fúngicas más frecuentes responsables de las pérdidas en sandía se encuentra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. Sin embargo, se desconoce con exactitud la diversidad de especies fúngicas que intervienen en el desarrollo de la enfermedad, por lo que en ocasiones las estrategias de control resultan deficientes. Determinar la presencia de una especie patogénica, así como el nivel de inóculo presente es indispensable para implementar estrategias integradas de control.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. Objetivo general**

Identificar mediante análisis morfológico y filogenético a las especies fúngicas asociadas a la pudrición de raíz en el cultivo de sandía en Sonora, México.

#### **III.2. Objetivos específicos**

III.2.1 Identificar las especies de hongos causantes de pudrición radicular en plantas de sandía en la Costa de Hermosillo y Valle de Guaymas en Sonora mediante análisis morfológicos y de filogenia multilocus.

III.2.2 Describir y comparar las características macroscópicas y microscópicas distintivas de las diferentes especies responsables de daño radicular.

III.2.3 Desarrollar protocolos de identificación y cuantificación rápida de hongos fitopatógenos mediante PCR múltiple y qPCR cuantitativa.

#### IV. RESULTADOS

En cumplimiento a los lineamientos de titulación, en el presente escrito se presentan cuatro publicaciones científicas, obtenidas como productos de los objetivos particulares planteados. Dos corresponden a primeros reportes sobre nuevos patógenos de sandía en la región y los otros dos a artículos en extenso. Además, un tercer artículo de investigación ha sido enviado para su publicación en *Plant Disease*, revista de investigación básica y aplicada publicado por la American Phytopathology Society.

**Tabla 4.** Relación de artículos científicos en cumplimiento a los objetivos particulares.

Título de la publicación	Incluida en	FI	Condición
First Report of Root Rot of Watermelon Caused by <i>Ceratobasidium</i> spp. in Sonora, Mexico. <i>Plant Disease</i> . Volume 98(6)847. 2014.	JCR	2.941	Publicado
First Report of Watermelon Wilting Caused by <i>Fusarium brachygibbosum</i> in Sonora, Mexico. <i>Plant Disease</i> . 99(5)729. 2015.	JCR	2.941	Publicado
Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. <i>Revista Mexicana de Fitopatología</i> . 36:233-255. 2018.	Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACYT	0.26	Publicado
Description and comparison among morphotypes of <i>Fusarium brachygibbosum</i> , <i>F. falciforme</i> and <i>F. oxysporum</i> pathogenic to watermelon in Sonora, México. <i>Revista Mexicana de Fitopatología</i> . 37(1). 2019.	Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACYT	0.26	Publicado
Molecular markers for multiplex detection and quantification of pathogenic <i>Fusarium</i> in watermelon. <i>Plant Disease</i> . 2019.	JCR	2.941	Enviado

FI = Factor de Impacto

**First Report of Powdery Mildew Caused by *Erysiphe heraclei* on Parsley in Korea.** S. E. Cho, M. J. Park, and J. H. Park, Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea; J. Y. Kim, Gyeonggi-Do Agricultural Research and Extension Services, Hwiseong 445-300, Korea; and H. D. Shin, Division of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea. Plant Dis. 98:847, 2014; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0972-PDN>. Accepted for publication 9 January 2014.

Parsley, *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman, is a minor but important leaf crop in Korea. In June 2010, parsley plants (cv. Paramount) showing typical symptoms of powdery mildew were found with approximately 90% incidence (percentage of plants showing symptoms) in polyethylene-film-covered greenhouses in an organic farm in Icheon County of Korea. Symptoms first appeared as thin white colonies, which subsequently showed abundant growth on the leaves with chlorosis and crinkling. Most diseased plantings were unmarketable and shriveled without being harvested. The damage due to powdery mildew infections on parsley has reappeared in Icheon County and Gangneung City with confirmation of the causal agent made again in 2011 and 2012. Voucher specimens were deposited in the Korea University Herbarium (KUS). Appressoria on the mycelium were multilobed or moderately lobed. Conidiophores were cylindrical, 75 to 125 × 8 to 10 μm, straight in foot-cells, and produced conidia singly, followed by 2 to 3 cells. Conidia were oblong-elliptical to oblong, 32 to 55 × 14 to 20 μm with a length/width ratio of 1.7 to 2.9, lacked fibrosin bodies, and produced germ tubes on the perihilar position, with angular/rectangular wrinkling of the outer walls. First-formed conidia were apically conical, basally truncate to rounded, and generally smaller than the secondary conidia. Chasmothecia were not found. These structures are typical of the powdery mildew *Pseudooidium* anamorph of the genus *Erysiphe*. The specific measurements and morphological characteristics were consistent with those of *E. heraclei* DC. (1). To confirm the identity of the causal fungus, the complete ITS region of rDNA from isolate KUS-P25037 was amplified with primers ITS5 and P3 (3) and sequenced directly. The resulting 606-bp sequence was deposited in GenBank (Accession No. KF680162). A GenBank BLAST search of this sequence revealed 100% identity with that of *E. heraclei* on *Anethum graveolens* from Korea (JN603995) and >99% similarity with those of *E. heraclei* on *Daucus carota* from Mexico (GU252368), *Pimpinella affinis* from Iran (AB104513), *Anthriscus cerefolium* from Korea (KF111807), and many other parsley family (Apiaceae) plants. Pathogenicity was verified through inoculation by gently pressing diseased leaves onto leaves of five healthy potted parsley plants. Five non-inoculated plants served as negative controls. Inoculated plants developed symptoms after 7 days, whereas the control plants remained symptomless. The fungus present on the inoculated plants was morphologically identical to that originally observed on diseased plants. Parsley powdery mildew caused by *E. heraclei* has been known in Europe, North America, Brazil, and Japan (2,4). To our knowledge, this is the first report of powdery mildew infections by *E. heraclei* on parsley in Korea. Since cultivation of parsley was only recently started on a commercial scale in Korea, powdery mildew infections pose a serious threat to safe production of this herb, especially those grown in organic farming where chemical options are limited.

**References:** (1) U. Besen and R. T. A. Cook. Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews). CBS Biodiversity Series No. 11. CBS, Utrecht, 2012. (2) D. F. Farr and A. Y. Rossman. Fungal Databases. Syst. Mycol. Microbiol. Lab., Online publication. ARS, USDA, retrieved September 17, 2013. (3) S. Takamatsu et al. Mycol. Res. 113:117, 2009. (4) Y. Tsuchi and K. Sogou. Proc. Assoc. Plant Prot. Shikoku 24:47, 1989.

e-Xtra

**First Report of Root Rot of Watermelon Caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico.** A. Meza-Moller, Universidad Estatal de Sonora, Unidad Académica Hermosillo, Ley Federal del Trabajo y Perimetral S/N, Hermosillo, Sonora, Mexico; and M. E. Rentería-Martínez, M. A. Guerra-Camacho, F. Romo-Tamayo, A. Ochoa-Meza, and S. F. Moreno-Salazar, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, Carretera a Bahía de Kino Km. 21, Hermosillo, Sonora, Mexico. Plant Dis. 98:847, 2014; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0974-PDN>. Accepted for publication 5 November 2013.

Watermelon is one of the major crops grown in Mexico and represents 4% of the total cultivated area with fruits in this country. In 2013, Sonora State was ranked second in the production of watermelon at a national level. Fungal and oomycete diseases are among the main biotic factors affecting watermelon production, particularly those caused by species of the genera *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia*. During the spring of 2013, wilting or death symptoms were confirmed in approximately 50% of ungrafted watermelon plants grown in four sampled fields along the coast of Hermosillo and Guaymas Valley in Sonora, Mexico. On both roots and stems of infected plants, localized lesions were found that were 0.2 to 2.0 cm long, reddish brown, and slightly sunken on the stem base. In some cases, the discolorations encompassed nearly 90% of the root system. One-centimeter pieces from the edge of lesions on stems and roots were superficially disinfected with 1% sodium hypochlorite, then rinsed with sterile distilled water, placed onto petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), and incubated at 25°C for 3 days. Fungal colonies were white initially, then turned brown, and septate hyphae were 3.7 to 4.3 μm in diameter and branched at right angles with a constriction at the origin of the branch point. These characteristics are typical of the genus *Rhizoctonia*. Binucleate cells from five isolates were observed using a lactophenol aniline blue solution stain, according to *Ceratobasidium* morphological descriptions. Mycelia from five isolates grown on PDA was used for DNA extraction. The rDNA-ITS region was amplified using PCR with the universal fungal primers ITS1 and ITS4 (3). The purified products were separately sequenced in both directions using the same primer pair. The sequences obtained were 99% similar to those of *Ceratobasidium* sp. AG-F and AG-Fa isolates (accessions KC193238.1 on *Taraxacum officinale*, HQ168370.1 on *Musa* spp., and JX913821.1 on soy-rice-weeds, respectively) from GenBank (2,4). The pathogenicity of the fungus was tested under growth chamber conditions. Sets of seven healthy watermelon seedlings of the Sugar red variety were inoculated with five isolates of *Ceratobasidium*. Three disks (8 mm in diameter) of mycelia grown on PDA were placed around the roots of each plantlet. The pots were maintained at 27 ± 0.1°C for 14 days with a photoperiod of 12 h. Seven uninoculated seedlings were used as a control. Initial symptoms showing water-soaked lesions developed on all inoculated seedlings within 6 to 7 days, while typical disease symptoms appeared after 10 to 14 days after inoculation. Seedlings without inoculum were free from infection. The fungus was re-isolated from the inoculated seedlings on PDA, and identified as *Ceratobasidium* sp., confirmed using morphological characteristics. A similar disease has been reported recently in Italy and Arizona (1); however, this report is the first description of a *Ceratobasidium* sp. causing root rot of watermelon in Sonora, Mexico. Agricultural areas where the study was carried represent 90% of the total area cultivated with watermelon in this state, so it is necessary to evaluate the impact of this pathogen in the crop.

**References:** (1) C. Nischwitz et al. APS joint meeting, 2013. (2) A. Saroj et al. Plant Dis. 97:1251, 2013. (3) T. J. White et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, 1990. (4) J. Yin et al. Plant Dis. 95:490, 2011.

**First Report of *Fusarium equiseti* Associated on Pecan (*Carya illinoensis*) Seeds in Brazil.** M. Lazarotto, M. F. B. Muniz, R. E. dos Santos, and E. Blume, Department of Plant Pathology, Federal University of Santa Maria, Brazil; R. Harakawa, Biological Institute of São Paulo, Brazil; and F. A. Hamann, Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) – Gartenbauwissenschaft Landwirtschaftliche Fakultät Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany. Plant Dis. 98:847, 2014; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0976-PDN>. Accepted for publication 9 December 2013.

Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] is an important producing nut tree that has been intensively cultivated in the state of Rio Grande do Sul (Brazil) in recent decades. This species is commonly grown in association with other crops and more often with cattle or sheep. An elevated incidence of the fungal genus *Fusarium* was observed during a quality control seed assay of pecan seeds obtained from orchards in the city of Anta Gorda (28°53'54.7" S, 52°01'59.9" W). Concomitantly, seedlings of this species, cultivated in a nursery, showed foliar necrosis, wilt, and root rot. The fungus was thereafter isolated from the seeds (from original seeds lots) and subcultured from single spores. Cultures were

(Disease Notes continued on next page)

Plant Disease / June 2014 847

# First Report of Watermelon Wilting Caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico

---

APS [apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN](http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN)

|  
Accepted for publication

<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN>

Mrs. Maria Eugenia Rentería, graduate student

Universidad de Sonora, Agricultura y Ganadería, Km. 20 carret. a Bahía de Kino, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83000, 52 662 5960296, 52 5960297;

Dr. Amparo Meza-Moller

Universidad Estatal de Sonora, Horticultura, Ley Federal del Trabajo y Perimetral S/N, Col. Apolo, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83100;

Mr. Miguel Angel Guerra-Camacho

Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería, Hermosillo, Sonora, Mexico;

Mr. Fernando Romo

Universidad de Sonora, Agricultura y Ganadería, Hermosillo, Sonora, Mexico;

Dr. Andres Ochoa-Meza

Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería, Carr. Bahia Kino km. 21, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83000;

Dr. Sergio Moreno-Salazar, Dr.

<http://www.printfriendly.com/print?url=http%3A%2F%2Fapsjournals.apsnet.org%2Fdoi%2Fabs%2F10.1094%2FPDIS-10-14-1073-PDN&partner=a2a#>

Universidad de Sonora, Agricultura y Ganadería, Km. 20 carret. a Bahía de Kino, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83000, 52 662 5960296, 52 5960297;

In May 2013 and May 2014, two fields in the Coast of Hermosillo and two of the Guaymas Valley, the major producing areas of watermelon in Sonora, Mexico, were sampled. Symptomatic watermelon plants exhibiting a cortical rot at the base of the stem and the upper portion of the taproot were observed and collected. Wilting and death was observed in approximately 50% of ungrafted watermelon plants in the sampled fields. One-centimeter pieces from the edge of lesions on stems and roots were superficially disinfected with 1% sodium hypochlorite, rinsed with sterile distilled water, placed onto petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), and incubated at 25°C for 3 days. Mycelia from 46 isolates were used for morphological and molecular identification. After DNA extraction, the rDNA-ITS region was amplified using PCR with the universal fungal primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990). The purified products were separately sequenced in both directions using the same primer pair. A five species fungi complex, potentially pathogenic, was identified: *Rhizoctonia solani*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Fusarium brachygibbosum*. *F. brachygibbosum* has not previously been reported as pathogenic in watermelon. Four different isolates of this fungal species were obtained. Two of them showed 100% nucleotide similarity with the GenBank accession No. KF985966 (Mirhosseini et al. 2014) and another two with 99% similarity to KF028369 both corresponding to *F. brachygibbosum*. The morphology of growth for this fungus showed white colonies with abundant aerial mycelium, which became pink, with yellow-orange spots, and red pigmentation in the agar. Few spores and oval microconidia were observed. Macroconidia were hyperbolically curved, with 3-5 marked septa, wide central cells, slightly sharp apices, and basal cells with foot shape. Terminal and intercalary chlamyospores, alone or in chain, usually unicellular and globose were also recorded. The pathogenicity was tested under growth chamber conditions. Sets of seven healthy watermelon seedlings of the Sugar Red variety were inoculated with the isolates of *F. brachygibbosum*. Three disks (8 mm in diameter) of mycelia grown on PDA were placed around the roots of each plantlet. Pots were maintained at  $27 \pm 0.1^\circ\text{C}$  for 14 days with a photoperiod of 12 h. Seven uninoculated seedlings were used as a control. After 10 or 14 days, all inoculated seedlings showed the typical disease symptoms as lesions of variable size and light brown-colored at neck and root, causing wilting of leaves or the whole plant. Seedlings without inoculum were free from infection and disease symptoms. The fungus was re-isolated from the inoculated seedlings, confirmed as *F. brachygibbosum* by sequencing of rDNA-ITS and confirmed by morphological characteristics as described by Padwick (1945). To our knowledge, this is the first description of this pathogen causing wilting on watermelon. Mexico is the world's eleventh largest producer of watermelon and the main exporter of watermelon in the world, providing 22.9% of this fruit in the world trade. In the last decade mexican exports have grown at an average annual rate of growth of 8% and its main target are United States, Canada and the Netherlands (FAOSTAT, 2014), in this regard, knowledge of fungal soil-borne pathogens in cultivated watermelon is necessary.

<http://www.printfriendly.com/print?url=http%3A%2F%2Fapsjournals.apsnet.org%2Fdoi%2Fabs%2F10.1094%2FFPDIS-10-14-1073-PDN&partner=a2#>



## Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico

### Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México

María Eugenia Rentería-Martínez, Miguel Ángel Guerra-Camacho, Andrés Ochoa-Meza, Sergio Francisco Moreno-Salazar\*, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Carretera Hermosillo-Bahía Kino Km. 21, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Alejandro Varela-Romero, Luis Enrique Gutiérrez-Millán, Posgrado en Biociencias, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio S/N, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Amparo del Carmen Meza-Moller, Universidad Estatal de Sonora, Avenida Ley Federal del Trabajo S/N, Colonia Apolo, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. \*Autor para correspondencia: smoreno@guayacan.uson.mx.

Recibido: 05 de Octubre, 2017.

Aceptado: 31 de Diciembre, 2017.

Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE, Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 233-255.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-1

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 09, 2018.

**Resumen.** El estado de Sonora es uno de los principales productores de sandía en México. Cada año, los productores locales enfrentan problemas fitosanitarios, provocados principalmente por hongos del suelo. En el presente estudio se analizó la presencia de hongos patógenos asociados con pudrición de raíz en plantas de sandía en las dos zonas de mayor producción en Sonora. El análisis

**Abstract.** The state of Sonora is one of the main producers of watermelons in Mexico. Each year, agricultural producers deal with phytosanitary issues like soilborne pathogens. In this study the presence of phytopathogenic fungi associated to watermelon root rot was analyzed in the main production regions of Sonora. Morphological analysis revealed three genera: *Fusarium* (73%), *Ceratobasidium* (20%) and *Rhizoctonia* (6%). Through a multilocus phylogenetic analysis (ITS1, TEF and RPB2 for *Fusarium*; ITS1 and RPB2 for *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium*), the following species were identified: *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*. In addition to this, two anastomosis groups for *Ceratobasidium* sp. (AG-F y AG-A) and two for *Rhizoctonia* spp. (AG-4 y AG-6) were identified. Pathogenicity assays showed that the representative isolates from these five different species caused root rot wounds and wilting in watermelon plantlets 21



morfológico reveló la presencia de tres géneros de hongos: *Fusarium* (73%), *Ceratobasidium* (20%) y *Rhizoctonia* (6%). Mediante un análisis filogenético multilocus (ITS1, TEF y RPB2 para *Fusarium*, ITS1 y RPB2 para *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*), se identificó a: *F. falciforme*, *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*, además de dos grupos anastomóticos de *Ceratobasidium* sp. (AG-F y AG-A) y dos de *Rhizoctonia* sp. (AG-4 y AG-6). Aislados representativos de estas cinco especies causaron pudrición de raíz y marchitez de plántulas de sandía a los 21 días después de su inoculación. En este estudio se informa por primera vez de *F. falciforme* y se define a nivel de grupos anastomóticos las cepas de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium* como causantes de pudrición radicular en sandía en la región.

**Palabras clave:** análisis multilocus, *Fusarium*, *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia*

México es el principal exportador de sandía en el mundo, aportando 23% de este fruto al comercio mundial (FAO, 2014), principalmente a Estados Unidos, Canadá y los Países Bajos. En los últimos diez años las exportaciones han crecido a una tasa promedio anual de 8% (SAGARPA, 2014). Sonora es el principal productor de sandía (*Citrullus lanatus*) en México. En 2016 se plantaron más de 9 000 ha en este estado (SIAP, 2017). No obstante, uno de los factores limitantes en la producción de sandía en este estado, son las enfermedades radiculares. En 2013, en ciertas plantaciones de sandía establecidas en los valles de Guaymas y la Costa de Hermosillo en Sonora, regiones que concentran alrededor del 96 % de la superficie estatal establecida con este cultivo, se observó que, previamente a su madurez fisiológica, ciertas plantas presentaron un amarillamiento y marchitamiento de hojas; días después las plantas murieron. El análisis visual

days post inoculation. In this study, *F. falciforme* is reported for the first time and anastomotic groups for *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* are defined as causal agents of watermelon root rot in the region.

**Key words:** MLST, *Fusarium*, *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia*

Mexico is the world's leading exporter of watermelon, with 23% of the total worldwide supply of the fruit (FAO, 2014), mainly to the United States, Canada and the Netherlands. In the last ten years, world exports have grown to an average rate of 8% a year (SAGARPA, 2014). Sonora is the main producer of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Mexico. In 2016, over 9 thousand hectares of this crop were planted in this state (SIAP, 2017). However, one of the limiting factors in Sonora's watermelon production are root diseases. In 2013, in certain watermelon plantations in the valleys of Guaymas and the Coast of Hermosillo in Sonora, areas that concentrate over 96% of the surface in the state with this crop, it was observed that before physiological maturity, certain plants presented yellowing and wilting of leaves; days later, the plants died. A visual analysis showed the presence of lesions and rotting in the cortex of the base of the stem and the top section of the main root, as well as rotting in the main and secondary roots, typical of diseases caused by fungi (Meza-Möller et al., 2014).

To date there is no knowledge on work published concerning the fungal complexes related to root rotting in watermelon plants grown in Sonora; diagnoses are generally based only on the symptoms of the crop and, in the best of cases, on the morphology of the colonies and the observation of reproductive structures. It is frequently mentioned that the root diseases in watermelon

demonstró la presencia de lesiones y pudrición en la corteza de la base del tallo y la parte superior de la raíz principal, además de pudriciones en las raíces principales y secundarias, típicas de las enfermedades ocasionadas por hongos (Meza-Möller *et al.*, 2014).

A la fecha no se tiene conocimiento de trabajos publicados acerca del complejo de hongos asociados a la pudrición de raíces en las plantas de sandía cultivadas en Sonora; generalmente los diagnósticos se basan solo en la sintomatología del cultivo y en el mejor de los casos en la morfología de las colonias y observación de estructuras reproductivas. Recurrentemente se menciona que las enfermedades radiculares de sandía cultivada en la región son debidas al ataque de: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* o *Rhizoctonia solani*.

Las especies pertenecientes al género *Fusarium* (Nectriaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota), son ubicuas y de gran importancia económica en la agricultura, ya que muchas de ellas son patógenas para las plantas. Algunas de sus especies también producen toxinas nocivas para humanos y animales. Este grupo monofilético está conformado por 20 clados que incluyen más de 300 especies. Con algunas excepciones, las especies de *Fusarium* producen las características macroconidias multi-septadas y con forma de huso; pero además existen otras características morfológicas que permiten diferenciar entre especies (O'Donnell *et al.*, 2013; Geiser *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015).

En el complejo *Rhizoctonia*, la morfología hifal y configuración del septo permiten diferenciar los géneros; mientras que las especies pueden ser distinguidas por el número de núcleos presentes en las células somáticas de hifas jóvenes y el grosor de las hifas guías, o por las características morfométricas de las estructuras reproductivas sexuales (Cedeño, 2008). El grupo de *Rhizoctonia* multinucleadas incluye a *R. solani*, *R. zea* y *R. oryzae*.

plants produced in the area are due to the attack of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* or *Rhizoctonia solani*.

The species belonging to the genus *Fusarium* (Nectriaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota), are ubiquitous and economically very important in agriculture, since most of them are pathogenic for plants. Some of their species also produce toxins harmful to humans and animals. This monophyletic group is composed of 20 clades that include over 300 species. With some exceptions, the *Fusarium* species produce the multi-shafted, macroconidial features and spindle shapes; but there are also other morphological characteristics that help to tell species apart (O'Donnell *et al.*, 2013; Geiser *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015).

In the *Rhizoctonia* complex, the hyphal morphology and configuration of the septum help differentiate the genera, whereas species can be told apart by the number of nuclei present in the somatic cells of young hyphae and the thickness of the guide hyphae, or by the morphometric characteristics of the sexual reproductive structures (Cedeño, 2008). The group of multinuclear *Rhizoctonia* includes *R. solani*, *R. zea* and *R. oryzae*.

*R. solani* [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*] (Ceratobasidiaceae: Cantharellales: Agaricomycetes: Basidiomycota), groups a heterogenous mixture of strains that cause root rotting in many crops around the world (González, 2013). According to the hyphal fusion analysis (anastomosis), these strains are split into 14 anastomotic groups (AG), labelled between AG-1 and AG-13, plus AG-BI (Carling *et al.*, 2002). The group of binuclear *Rhizoctonia* corresponds to the teleomorphs *Ceratobasidium* spp. and *Tulasnella* spp. According to Sharon *et al.* (2008), *Ceratobasidium* is composed of 21 anastomotic groups identified as AG-A to AG-U, some of which are highly pathogenic in different plant species.



*R. solani* [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*] (Ceratobasidiaceae: Cantharellales: Agaricomycetes: Basidiomycota), agrupa una mezcla heterogénea de cepas causantes de pudrición radicular en muchos cultivos alrededor del mundo (González, 2013). De acuerdo al análisis de fusión hifal (anastomosis), estas cepas se separan en 14 grupos anastomóticos (AG), designados desde AG-1 hasta AG-13 más AG-BI (Carling *et al.*, 2002). El grupo de *Rhizoctonia* binucleadas corresponde a los teleomorfos *Ceratobasidium* spp. y *Tulasnella* spp. De acuerdo a Sharon *et al.* (2008), *Ceratobasidium* consta de 21 grupos anastomóticos identificados como AG-A hasta AG-U, algunos de los cuales son altamente patógenicos en diferentes especies vegetales.

En el pasado la taxonomía de hongos se basaba en la morfología de sus estructuras reproductivas en el estado anamórfico. El concepto de especie morfológica aún prevalece como el método de diagnóstico más usual para diferenciar entre especies de hongos, debido a que los caracteres morfológicos de los individuos son fácilmente detectables y comparables. Sin embargo, no es un método capaz de detectar diferencias entre especies cercanas, subestimando la verdadera diversidad fúngica (Taylor *et al.*, 2000).

Las técnicas moleculares basadas en análisis de ADN superan las desventajas de la identificación morfológica ya que son rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras. Permiten diferenciar entre genotipos y establecer índices de variabilidad genética existente dentro de una población (Narayanasamy, 2011). En años recientes se ha popularizado el concepto de especie filogenética entre los hongos filamentosos, basado en la concordancia de secuencias de múltiples genes de ADN; este enfoque filogenético permite definir mejor las especies (Taylor *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2013).

In the past, fungus taxonomy was based on the morphology of their reproductive structures in the anamorphic state. The concept of morphological species still prevails as the most common diagnostic method to differentiate fungal species, since the morphological characteristics of individuals are easily traceable and comparable. However, this method is unable to find differences between nearby species, underestimating the true fungal diversity (Taylor *et al.*, 2000).

The molecular techniques based on DNA analysis surpass the disadvantages of morphological identification, since they are quick, precise, objective and applicable to a large number of samples. They help differentiate between genotypes and to establish genetic variability indices within a population (Narayanasamy, 2011). In recent years, the concept of phylogenetic species between filamentous fungi has become increasingly popular, based on the consistency of multiple DNA gene sequences; this phylogenetic approach helps define species better (Taylor *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2013).

Since White *et al.* (1990) published the sequences of primers that allowed the amplification and sequencing of sections of the rDNA operon, an interest arose in phylogenetic research, which now dominates fungal taxonomy. The sequencing of the ITS fragments of rDNA continues to be the most widely accepted approach in molecular mycology to classify and identify specimens or cultures of unknown fungi. However, its resolution in taxonomic relations of a higher level is inferior to many other genes. Numerous studies have been carried out to identify *loci* with characteristics of adequate primary barcodes. The AFTOL (Assembling the fungal tree of life) project, completed in 2008, has established a phylogeny based on the amplification of genes RPB1, RPB2, nucLSU, nucSSU, mtSSU, TEF1 $\alpha$  and mtATP6

Desde que White *et al.* (1990) publicaron las secuencias de cebadores que permitieron la amplificación y secuenciación de secciones del operón de rDNA, surgió un marcado interés en la investigación filogenética, que ahora domina la taxonomía fúngica. La secuenciación de los fragmentos ITS de rDNA, sigue siendo el enfoque más ampliamente aceptado en la micología molecular para clasificar e identificar especímenes o cultivos de hongos desconocidos. Sin embargo, su resolución en relaciones taxonómicas de nivel superior es inferior a muchos otros genes. Numerosos estudios se han realizado para identificar *loci* con características de código de barras primarias adecuadas. El proyecto AFTOL (Assembling the fungal tree of life), completado en 2008, ha establecido una filogenia basada en la amplificación de los genes: RPB1, RPB2, nuLSU, nucSSU, mtSSU, TEF1 $\alpha$  y mtATP6 (Stielow *et al.*, 2015). El conocimiento de las especies causantes de una enfermedad es indispensable para su adecuado manejo y control.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar las especies de hongos causantes de pudrición radicular en plantas de sandía en la Costa de Hermosillo y Valle de Guaymas en Sonora, en base a análisis morfológicos y de filogenia multilocus.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo:** El estudio se realizó durante los ciclos primavera-verano 2013 y 2014, en cuatro campos comerciales, dos localizados en la Costa de Hermosillo (CH1, CH2) y dos en el Valle de Guaymas (VG1, VG2), en Sonora, México que representan el 10% de la superficie establecida con sandía en el estado. Las variedades cultivadas en estos campos fueron Sugar Red, SuperSeedless 7187HQ F1 y Precious Petit. En cada ciclo se colectaron alea-

(Stielow *et al.*, 2015). Knowing the species that cause a disease is crucial for their adequate management and control.

Based on this, the aim of the present investigation was to identify the fungus species that cause rotting of the roots in watermelon plants in the Coast of Hermosillo and Valley of Guaymas in Sonora, based on morphological and multilocus phylogeny analyses.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling:** The study was carried out during the spring-summer cycles of 2013 and 2014, in four commercial fields, two of which were located on the Coast of Hermosillo (CH1, CH2) and two in the Valley of Guaymas (VG1, VG2), in Sonora, Mexico, which account for 10% of the state's surface used for the production of watermelon. The varieties planted in these fields were Sugar Red, SuperSeedless 7187HQ F1 and Precious Petit. In each cycle, 40 plants (10 plants per field) were collected at random in the areas with wilting and dryness of runners. The samples were placed in polyethylene bags, which were labelled and transported in containers with ice to the laboratory for processing.

**Fungal isolation.** The plant roots were washed using water, dried with paper towels, and cut into 1 cm pieces. Segments were taken from the crown, main root and secondary roots. They were disinfected by submerging them for 2 min in a solution prepared with sodium hypochlorite at 6%, ethyl alcohol at 96% and sterilized distilled water in a 1:1:8 ratio, respectively. They were then placed in dishes with agar-water at 2%. The dishes were incubated at  $25 \pm 0.1$  °C until the mycelium produced from the pieces of plant allowed for the extraction of a



toriamente 40 plantas (10 plantas por campo) en las zonas donde se observaba marchitez y secazón de guías. Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno etiquetadas y transportadas en contenedores con hielo al laboratorio para su procesamiento.

**Aislamiento fúngico.** Las raíces de plantas enfermas se lavaron con agua, se secaron con papel secante y se cortaron en pedazos de 1 cm. Se tomaron segmentos de la corona, raíz principal y raíces secundarias. Se desinfectaron sumergiéndolos por 2 min en una solución preparada con hipoclorito de sodio al 6%, alcohol etílico al 96% y agua destilada esterilizada en proporción 1:1:8, respectivamente. Posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron en papel secante estéril y se colocaron en cajas con agar-agua al 2%. Las cajas se incubaron a  $25 \pm 0.1$  °C hasta que el micelio emergido de los trozos vegetales permitió tomar una punta de hifa. Las puntas de hifas fueron cultivadas sucesivamente en Agar Dextrosa y Papa (PDA) suplementado con una solución de estreptomycin/neomicina e incubados a  $25 \pm 0.1$  °C, hasta obtener un cultivo puro.

**Caracterización morfológica y cultural.** Todos los aislados fueron agrupados en base a las características de las colonias y al color desarrollado en el anverso y reverso de la caja de PDA. Un aislado representativo de cada grupo fue utilizado para la caracterización morfológica. En los aislados con características de *Fusarium* se determinó la presencia y morfología de microconidias, macroconidias y clamidosporas a partir de su crecimiento en agar hojas de clavel (CLA), después de siete días en oscuridad a  $25 \pm 0.1$  °C (Leslie and Summerell, 2006). Los aislados con características del género *Rhizoctonia* se identificaron mediante la observación de características vegetativas como la coloración del

hypha tip. The hypha tips were planted successfully in Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with a solution of streptomycin/neomycin and incubated at  $25 \pm 0.1$  °C, until a pure culture was obtained.

**Morphological and cultural characterization.** All isolates were grouped based on the characteristics of the cultures and the color developed on both sides of the PDA plate. A representative of each group was used for the morphological characterization. In the isolations with characteristics of *Fusarium* the presence and morphology of microconidia, macroconidia, and Chlamydospores was established from their growth in carnation leaf agar (CLA), after seven days in the dark at  $25 \pm 0.1$  °C (Leslie and Summerell, 2006). The isolations with characteristics of *Rhizoctonia* genus were identified by observing vegetative characteristics such as the color of the mycelium, septa, constrictions near the ramifications, during growth in PDA or Malt Extract Agar (MEA). To determine the number of nuclei, hyphae were stained with trypan blue in lactophenol. Growth rate was determined in PDA, keeping the cultures at  $25 \pm 0.1$  °C and photoperiods of 14h/10h of light/darkness. The diameter of the culture was measured every 24 h until the mycelium covered the dish completely (Sneh *et al.*, 1996). All isolations were initially identified up to the genus level.

**DNA Extraction.** A mycelia from pure cultures in PDA were taken with a sterile microbiological spatula and placed in a tube of the Kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO Laboratories, California, U.S.A.). Cell lysis was carried out in a Precellys Evolution Homogenizer (Bertin Technologies, France), stirring the tubes at 6500 rpm for three 20 s cycles with 20 s pauses. DNA integrity was verified in a 2% agarose gel. The extracted DNA was quantified in the NanoDrop 1000

micelio, septos, constricciones cerca de la ramificación, durante el crecimiento en PDA o agar extracto de malta (MEA). Para la determinación del número de núcleos, las hifas se tiñeron con azul de tripano en lactofenol. La velocidad de crecimiento se determinó en PDA, manteniendo los cultivos a  $25 \pm 0.1$  °C y fotoperiodo de 14h/10h, de luz/oscuridad. Se midió el diámetro de las colonias cada 24 h, hasta que el micelio cubrió completamente la caja (Sneh *et al.*, 1996). Todos los aislados fueron identificados inicialmente hasta nivel de género.

**Extracción de ADN.** El micelio proveniente de cultivos puros en PDA, se recogió con espátula microbiológica estéril y se colocó en un tubo del Kit Power Soil DNA Isolation (MoBIO Laboratories, California, EUA). La lisis celular se llevó a cabo en un homogeneizador Precellys Evolution (Bertin Technologies, Francia), agitando los tubos a 6500 rpm durante tres ciclos de 20 s con pausas de 20 s. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 2%. El ADN extraído, se cuantificó en el NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Sólo se amplificaron muestras con una relación de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

**Amplificación y secuenciación de ADN.** Se amplificó la región no codificante del espaciador transcrito interno (ITS) y una parte de la región que codifica para la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2) de todos los aislados obtenidos. Adicionalmente, se amplificó la región que codifica para el factor de elongación de la transcripción 1 $\alpha$  (TEF-1  $\alpha$ ) para los aislados con características de *Fusarium*. La información sobre los primers empleados se muestra en la Cuadro 1.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó mezclando 12.5 ml de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 ml de cada primer forward y

(ThermoScientific). Samples with an absorbance ratio of 260/280 between 1.8 and 2 were amplified. The DNA was stored at -20°C until its use.

**DNA amplification sequencing.** The non-coding region of the internal transcribed spacer (ITS) was amplified with a segment of the region that codified for the DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) of all the isolations obtained. In addition, it was amplified the region that codifies for translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF1) for the isolates with *Fusarium* characteristics. Information about the primers used is shown in Table 1.

The polymerase chain reaction was carried out by mixing 12.5 ml of GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1  $\mu$ l of each forward and reverse primer (IDT Technologies) 10 mM, 1  $\mu$ l of DNA (1 ng/ $\mu$ l) and molecular biology degree water up to 25  $\mu$ l final volume. The PCR products were separated by electrophoresis in agarose gel at 2%, dyed with GelRed (Biotium Inc) in 5X Green GoTaq reaction buffer (Promega) 15  $\mu$ l:1ml. They were visualized in UV light (DigiDoc-It™, UVP) observing the size of the amplicon and its purity. Purification was carried out using ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) or with by cutting bands of the expected size with the Wizard® SV Gel kit and PCR Clean-Up System (Promega). Purified amplicons were sequenced in both directions with ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) in GENEWIZ. Each sequence was reviewed manually and nucleotides in ambiguous positions were corrected with complementary sequences obtained with both primers, using the software ChromasPro v2.1.6. The sequences from regions ITS, RPB2 and TEF were compared by alignment with those contained in the databases *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), *Fusarium* ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) and in



**Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados en este estudio.**  
**Table 1. Oligonucleotides used in this study.**

Locus	Primer	Oligonucleótidos (5'-3')	(pb)	Referencia
ITS	ITS1	TCCGAGGTGAACCTGCGG	= 550	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	TCCGCCGCTTATTGATATGC		
TEF-1a	EF1	ATGGGTAAGGARGACAACAC	= 700	O'Donnell <i>et al.</i> (1998)
	EF2	GGARGTACCAGTSATCAT		
RPB2*	RPB2-5F2 IRPB2-7cR	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	= 900	O'Donnell <i>et al.</i> (2013)
RPB2*	RPB2-980F IRPB2-7cR	TGYCCIGCIGARACICCHGARGG CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	= 674	González <i>et al.</i> (2016)

\*Específicos para el género *Fusarium* / Specific to the genus *Fusarium*.

\*Específicos para el género *Rhizoctonia* / Specific to the genus *Rhizoctonia*.

reverse (IDT Technologies) a una concentración 10 mM, 1 µl de ADN a una concentración de 1 ng/ml y agua grado biología molecular hasta obtener un volumen final de 25 µl. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, mezclados previamente con GelRed (Biotium Inc) en 5X Green GoTaq reaction buffer (Promega) 15 µl:1ml. Se visualizaron en luz UV (DigiDoc-H™, UVP) observando el tamaño del amplicón y su pureza. La purificación se realizó con ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) o mediante el corte de bandas del tamaño esperado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Los amplicones purificados se secuenciaron en ambas direcciones con el equipo ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) en GENEWIZ. Cada secuencia se revisó manualmente y los nucleótidos en posiciones ambiguas se corrigieron con las secuencias complementarias obtenidas con ambos primers, usando el software ChromasPro v2.1.6. Las secuencias de las regiones ITS, RPB2 y TEF de *Fusarium* se compararon mediante alineamiento, con las contenidas en las bases de datos: *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), *Fusarium* ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) y National Center for Biotechnology Information (NCBI), donde también se compararon las secuencias de las regiones ITS y RPB2 de

the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in which the sequences from regions ITS and RPB2 of *Rhizoctonia* spp. were also compared, using the "Basic local alignment search tool" (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

**Phylogenetic analysis.** The *Fusarium* species and the anastomosing groups of *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* were determined separately in two data matrices. In each case, several alignments were carried out using the software Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). The sequences were linked and edited using the software UltraEdit32. The phylogenetic analysis of each data matrix was carried out separately under the criterion of Maximum Likelihood Estimation (MLE) with the software PAUP 4.0a152 (Swofford, 2002). The best nucleotide substitution model was established using ModelTest (Posada and Crandall, 1998). The trees were viewed and modified in FigTree and exported to graphic editors. The consensus trees for *Rhizoctonia* spp. and *Fusarium* spp., were rooted using *Botryobasidium simile* (isolation GEL2348) and *Neofusicoccum parvum* (strain CCF216), respectively.

**Pathogenicity tests.** In compliance with Koch's postulates, to assure that the isolates obtained were

*Rhizoctonia* spp., mediante la herramienta "Basic local alignment search tool" (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

**Análisis filogenético.** La determinación de las especies de *Fusarium* y de los grupos anastomóticos de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*, se realizó por separado en dos matrices de datos. En cada caso, se realizaron múltiples alineamientos usando el software Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). La concatenación y edición de las secuencias se realizó con el software UltraEdit32. El análisis filogenético de cada matriz de datos se realizó por separado bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (MV) con el software PAUP 4.0a152 (Swofford, 2002). Se estableció el mejor modelo de sustitución de nucleótidos con ModelTest (Posada y Crandall, 1998).

Los árboles se visualizaron y modificaron en FigTree y se exportaron a editores gráficos. Los árboles consenso para *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., se enraizaron con *Botryobasidium simile* (aislado GEL2348) y *Neofusicoccum parvum* (cepa CCF216), respectivamente.

**Pruebas de patogenicidad.** En cumplimiento con los postulados de Koch, para comprobar que los aislados obtenidos son los agentes causales de la pudrición de raíz en plantas de sandía, se seleccionó aleatoriamente un cultivo monospórico de cada una de las especies identificadas en el análisis molecular. Los tratamientos fueron: 1) Testigo sin inocular, 2) *F. falciforme*, 3) *F. oxysporum*, 4) *F. brachygibbosum*, 5) *R. solani*, 6) *Ceratobasidium* sp., 7) *F. brachygibbosum* + *F. solani*, 8) *F. brachygibbosum* + *F. oxysporum*, 9) *R. solani* + *Ceratobasidium* sp., 10) *Ceratobasidium* sp. + *F. solani* y 11) *Ceratobasidium* sp. + *F. oxysporum*. Se utilizaron plantas sanas de las variedades SuperSeedless 7187HQ F1 y Precious Petit, de 21 días de edad, establecidas en macetas con una mezcla de

the causal agents of the root rotting in watermelon plants, a monosporic culture was chosen at random from each one of the species identified in the molecular analysis. The treatments were: 1) Non-inoculated control, 2) *F. falciforme*, 3) *F. oxysporum*, 4) *F. brachygibbosum*, 5) *R. solani*, 6) *Ceratobasidium* sp., 7) *F. brachygibbosum* + *F. solani*, 8) *F. brachygibbosum* + *F. oxysporum*, 9) *R. solani* + *Ceratobasidium* sp., 10) *Ceratobasidium* sp. + *F. solani* and 11) *Ceratobasidium* sp. + *F. oxysporum*. Healthy plants of the varieties SuperSeedless 7187HQ F1 and Precious Petit, aged 21 days, established in pots with a mixture of soil and perlite (1:3). Six plants were inoculated for each treatment. Each plant was treated with rotting and discoloration of vascular bundles, typical symptoms of damages by *Fusarium* spp. Four discs, 8 mm in diameter, were placed around the root. Healthy plants treated with sterile PDA discs were used as controls. The pots were placed in a controlled environment chamber at 25 ± 0.1 °C, with a photoperiod of 14h/10h day/night, until the appearance of symptoms. Irrigation was carried out based on water requirements, and a Hoagland nutrient solution was applied on a weekly basis. The number of disease plants was observed. The percentage of infected roots was determined using ten root segments from each plant. These tissue fragments were disinfected separately and placed in PDA. The evaluation was carried out observing the development of mycelia after seven-day incubation.

## RESULTS

**Damages observed during sampling.** Figure 1A shows the damages observed in the crop. Plants with symptoms displayed different types of rotting in the crown, stem, roots and rootlets. One type of



suelo:perlita (1:3). Se inocularon seis plantas por cada tratamiento. Cada planta se trató con micelio de cinco días de crecimiento en PDA. Se colocaron cuatro discos de 8 mm de diámetro alrededor de la raíz. Plantas sanas tratadas con discos de PDA estéril se utilizaron como testigo. Las macetas se colocaron en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 0.1$  °C, con un fotoperiodo de 14h/10h día/noche, hasta la aparición de los síntomas. El riego se realizó en base a los requerimientos hídricos y cada semana se aplicó solución nutritiva de Hoagland. Se observó el número de plantas enfermas. El porcentaje de raíces infectadas se determinó utilizando diez segmentos de raíz de cada planta. Estos fragmentos de tejido se desinfectaron por separado y se colocaron en PDA. La evaluación se realizó observando el desarrollo de micelio después de 7 días de incubación.

## RESULTADOS

**Daños observados durante el muestreo.** La Figura 1A muestra los daños observados en el cultivo. Las plantas sintomáticas presentaron diferentes tipos de pudrición en la corona, tallo, raíces y raicillas. Un tipo de lesiones fueron pequeñas, hundidas y no hundidas, de color marrón (Figura 1B) y de aspecto húmedo, típicas de *Rhizoctonia* sp. En ciertos casos este tipo de lesiones se observaron con pequeñas pústulas. En otras plantas las lesiones

lesion was small, concave or not, brownish (Figure 1B) and moist-looking, typical in *Rhizoctonia* sp. In certain cases, this type of lesions was observed to have small pustules. In other plants, lesions were light brown, discolored and with vascular beam rot, typical in symptoms of damages by *Fusarium* spp. (Figure 1C).

**Isolation and morphology of the colonies and reproductive structures of fungi.** A total of 45 fungal isolates were obtained from the four sampling sites, and in each one, at least one species of *Rhizoctonia* and *Fusarium* was isolated. The distribution of species by site is shown in Figure 2.

The morphological analysis helped to form two groups of isolates. One group was formed of 13 isolations that presented colonies with abundant aerial hyphae, ivory-colored at first, turning light brown or brown after 7 days. In these isolations, hyphae were robust, with branches in right angles, constriction of the ramification and the formation of a septum near the point of origin, without spores, all of which are typical characteristics of *Rhizoctonia* sp. (Sneh *et al.*, 1996). Average growth rate was  $1.25 \text{ mm h}^{-1}$ . Nuclei staining revealed the presence of isolates with both binuclear and multinuclear cells (Figure 3).

The second group of 32 isolates showed the formation of macroconidia, microconidia, chlamyospores and monophyalides in CLA, typical of *Fusarium* sp., according to descriptions



Figura 1. Daños en plantas cultivadas de sandía. A) Daño en campo, B) Raíces de plantas enfermas, C) Daño vascular.  
Figure 1. Damage on planted watermelon crops. A) Damage on the field, B) Roots of diseased plants, C) Vascular damage.

fueron de color café claro, con decoloración y pudrición de haces vasculares, típicas de síntomas de daños por *Fusarium* spp. (Figura 1C).

**Aislamiento y morfología de las colonias y estructuras reproductivas de los hongos.** En total, se obtuvieron 45 aislados fúngicos provenientes de los cuatro sitios de muestreo y en cada sitio se aisló al menos una especie de *Rhizoctonia* y *Fusarium*. La distribución de especies por sitio se muestra en la Figura 2.

El análisis morfológico permitió formar dos grupos de aislados. Un grupo formado de 13 aislados que presentaron colonias con abundantes hifas aéreas, de color marfil al inicio, tornándose café claro o marrón después de siete días. En estos aislados las hifas fueron robustas con ramificaciones en ángulo recto, constricción de la ramificación y formación de un septo cercano al punto de origen, sin presencia de esporas, características típicas de *Rhizoctonia* sp. (Sneh *et al.*, 1996). La velocidad de crecimiento promedio fue de 1.25 mm h<sup>-1</sup>. La tinción de núcleos reveló la presencia tanto de aislados con células binucleadas, como multinucleadas (Figura 3).

El segundo grupo de 32 aislados mostró la formación de macroconidias, microconidias, clamidosporas y monofialides en CLA, típicas de *Fusarium* sp., según las descripciones de Leslie y Summerell (2006). 25 aislados se ajustaron a la descripción de *F. solani*: colonias color crema con pigmentos rojo a gris oscuro en el anverso, microconidias ovales sin septos, monofialides largas, clamidosporas solas o en pares, abundantes macroconidias rectas con 3 a 5 septos. Otros 2 presentaron características propias de *F. oxysporum*: micelio algodonoso, escaso blanco a violeta pálido y morado en el agar; monofialides cortas. El resto de los aislados produjo micelio blanco, el cual se tornaba rosado, con esporodocios de color amarillo;

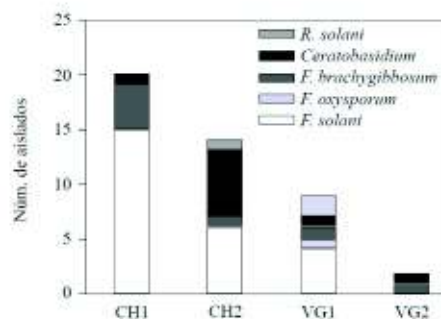


Figura 2. Distribución de especies de hongos patógenos, por sitios de muestreo. CH1= Costa de Hermosillo 1, CH2=Costa de Hermosillo 2, VG1=Valle de Guaymas 1, VG2=Valle de Guaymas 2.

Figure 2. Distribution of pathogenic fungi species, by sampling sites, CH1= Coast of Hermosillo 1, CH2=Coast of Hermosillo 2, VG1=Valley of Guaymas 1, VG2=Valley of Guaymas 2.

by Leslie and Summerell (2006). Twenty-five isolations fit the description of *F. solani*: cream-colored colonies with red to dark gray pigments in the obverse oval-shaped microconidia without septa, long monophyalides, single or paired chlamydo-spores, abundant straight macroconidia with 3 to 5 septa. Other 2 presented typical characteristics for *F. oxysporum*: cottonlike mycelia, scarce white to pale violet and purple color in the agar; short monophyalides. The rest of the isolates produced white mycelia, which turned pink, with yellow sporodochia; oval unicellular microconidia, produced in monophyalides, curved macroconidia with 3 to 5 septa, with wide central cells, slightly pointy apex, single or chained chlamydo-spores (Figure 3). No isolations were found with different morphology to *Rhizoctonia* or *Fusarium*.

**Molecular identification and phylogenetic analysis of fungi.** A first BLAST analysis from the region between the internal transcribed spacers



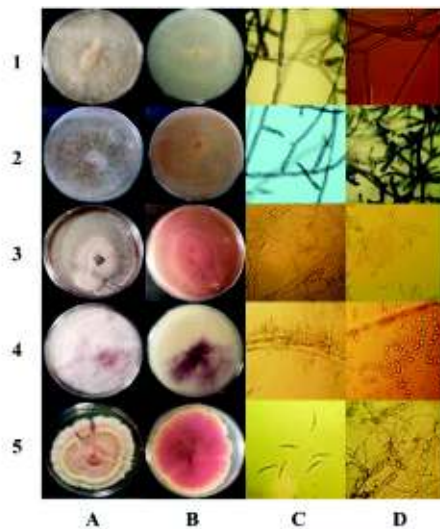


Figura 3. Morfología de las colonias y coloración del medio en PDA de *Rhizoctonia* spp., *Ceratobasidium* sp., *F. falciforme*, *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum*, (1A-5A y 1B-5B) respectivamente. (1C) Hifas polinucleadas. (1D) Septos. (2C) Hifas binucleadas. (2D) Células moniloides. (3C) Monofialides y microconidias. (3D) Macroconidias. (4C) Microconidia *in situ* en CL.A. (4D) Microconidia. (5C) Macroconidia. (5D) Clamidosporas.

Figure 3. Morphology of the colonies and colors of the medium in PDA of *Rhizoctonia* spp., *Ceratobasidium* sp., *F. falciforme*, *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum*, (1A-5A and 1B-5B) respectively. (1C) Polynuclear hyphae. (1D) Septa. (2C) Binuclear hyphae. (2D) Moniloid cells. (3C) Monophialides and microconidia. (3D) Macroconidia. (4C) Microconidi *in situ* in CL.A. (4D) Microconidia. (5C) Macroconidia. (5D) Clamidosporas.

microconidias ovales unicelulares, producidas en monofialides, macroconidias curvadas de 3 a 5 septos, con células centrales anchas, ápice ligeramente agudo, clamidosporas solas o en cadena (Figura 3). No se detectaron aislados con morfología diferente a *Rhizoctonia* o *Fusarium*.

I and II (ITS1-ITS2) of all the isolates helped determine that 25 sequences had a similarity of 99-100% with *F. solani*; 5 to *F. brachygibbosum*, 2 to *F. oxysporum*, 10 to *Ceratobasidium* sp. and 3 sequences to *Rhizoctonia solani* also with a similarity of 99-100% to NCBI homologous sequences.

The phylogenetic analysis under the ML criterion for the *Fusarium* genus was carried out with the linked matrix of genes ITS, RPB2 and TEF1 of the 32 isolations of this study and of 25 reference strains deposited in culture collections (Al-Hatmi *et al.*, 2016). The best nucleotide substitution model was TIM2+I+G. Total of 1816 nucleotides were considered in the data set. The multilocus analysis helped define the correct identity of the isolations initially proposed as *F. solani*, since they form a separate clade with a similarity of 100 % with the type isolations of *F. falciforme*, a member of the *Fusarium solani* species complex (FSSC). The identity of *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum* was corroborated (Figure 4).

A similar analysis was carried out with the sequences of isolations from *Rhizoctonia* and *Ceratobasidium* sp. a data matrix was integrated by the regions ITS and RPB2 of 49 isolations, including those from the present study and 36 references strains (*Cantharellales*), obtained from culture collections (González *et al.*, 2016). The best nucleotide substitution model was GTR+I+G. Total of 1355 nucleotides were considered from each isolation in the data set. This analysis established the identity of two anastomosis groups for the genus *Rhizoctonia*, AG-4 and AG-6 and two for the genus *Ceratobasidium*, AG-A and AG-F (Figure 5). Table 2 shows the identity and the accession numbers of the sequences obtained.

**Pathogenicity tests:** The appearance of symptoms in plants took place 14 days after inoculation, in

**Identificación molecular y análisis filogenético de los hongos.** Un primer análisis BLAST a partir de la región comprendida entre el espaciador transcrito interno I y II (ITS1-ITS2) de todos los aislados, permitió determinar que 25 secuencias tenían un 99-100% de similitud a *F. solani*; 5 a *F. brachygibbosum*, 2 a *F. oxysporum*, 10 a *Ceratobasidium* sp. y 3 secuencias a *Rhizoctonia solani* también con 99-100% de similitud con secuencias homólogas de NCBI.

El análisis filogenético bajo el criterio de MV para el género *Fusarium* se realizó con la matriz concatenada de las secuencias de los genes ITS, RPB2 y TEF1 de los 32 aislados de este estudio y de 25 cepas de referencia depositadas en colecciones de cultivos (Al-Hatmi *et al.*, 2016). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue TIM2+I+G. Se consideraron 1816 nucleótidos en el conjunto de datos. El análisis multilocus permitió definir la identidad correcta de los aislados inicialmente propuestos como *F. solani*, ya que éstos forman un clado separado con 100 % de similitud con los aislados tipo de *F. falciforme*. Un integrante del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC). La identidad de *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum* fue corroborada (Figura 4).

Un análisis similar, se realizó con las secuencias de los aislados de *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium* sp. Se procesó una matriz integrada por las regiones ITS y RPB2 de 49 aislados, incluyendo los del presente estudio y 36 cepas de referencia (*Cantharellales*), obtenidas de colecciones de cultivos (González *et al.*, 2016). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos fue GTR+I+G. Se consideraron 1355 nucleótidos de cada aislado en el conjunto de datos. Este análisis estableció la identidad de dos grupos anastomóticos para el género, AG-4 y AG-6 y dos para el género *Ceratobasidium*, AG-A y AG-F. (Figura 5). El Cuadro 2 muestra la identidad y los números de accesión de las secuencias obtenidas.

the form of lesions in the roots and the base of the stem. All the isolation and their combinations caused the death of the plants after 21 days. Table 3 shows the percentage of infected roots in each treatment. Control plants presented no symptoms.

## DISCUSSION

Although Sonora is the main watermelon producing state in Mexico, there are no formal reports on the fungi related to rotting. The pathological data in this investigation show that, individually or in a group, at least five different fungal species caused root rot, which led to death of watermelon plants before they reached physiological maturity, during the formation and development of fruits. The characteristics of the colonies, morphology, nuclei staining and phylogenetic analysis of sequences helped to identify two species of the Ceratobasidiaceae family: *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp., and three of the *Fusarium* genus: *F. falciforme*, *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum*, showing that there is a diverse community of fungi causing root rot in watermelon planted in the Coast of Hermosillo and the Valley of Guaymas, Sonora.

The predominant species was found to be *F. falciforme*, with 25 isolations from three fields of the two sites sampled. Initially, this fungus was identified as the polytypic morphospecies *F. solani*. Based on the linked phylogenetic analysis of the regions ITS, TEF-1 $\alpha$  and RPB2 using ML, a separate clade is formed within the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC). This complex groups at least 60 different species that, because of the similarity in the morphology of their conidia, are known as cryptic species. They have a wide range of hosts and have been subdivided into *formae speciales*, depending on the specificity of the host (O'Donnell *et al.*, 2015). Recent phylogenetic



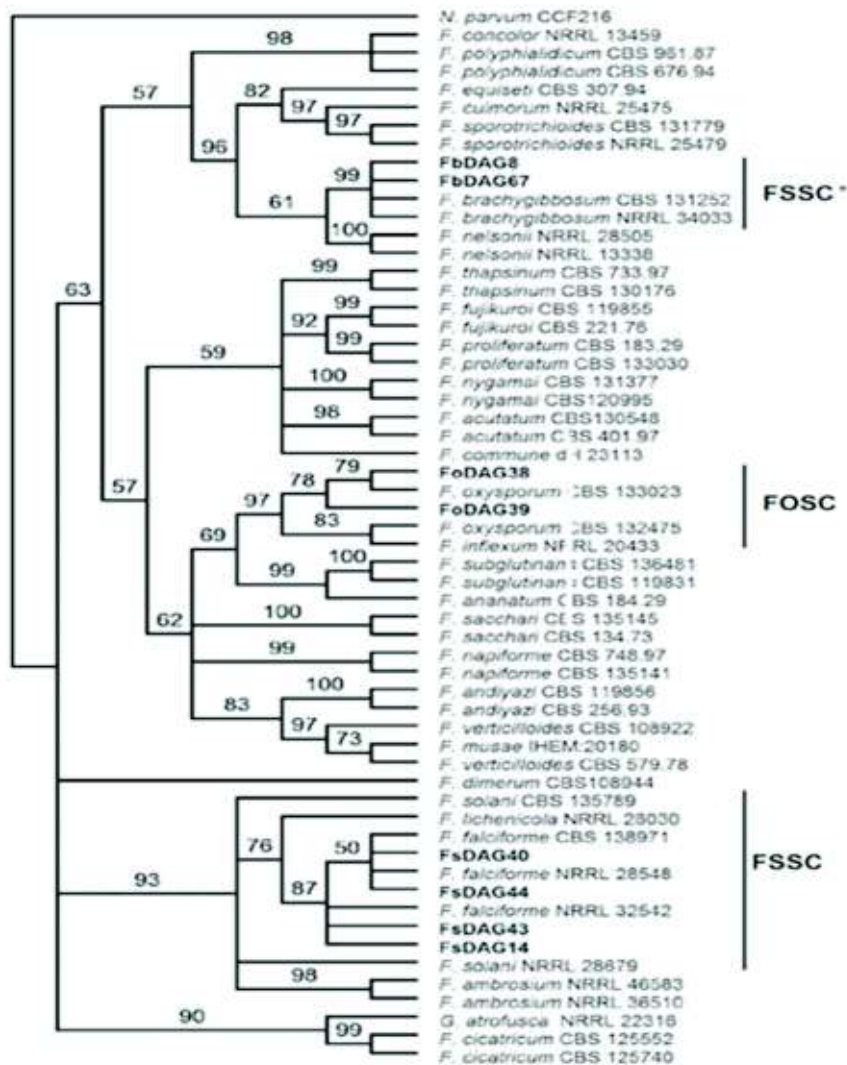


Figura 4. Filogenia por MV de las secuencias concatenadas de los genes ITS, EF y RPB2 de 8 aislados de *Fusarium* spp. (en negritas) representativos de 29 obtenidos de plantas de sandía con marchitez y pudrición de raíz. Bootstrap de 1000 réplicas; grupo externo: *Neofusicoccum parvum*.

Figure 4. Phylogeny by MV of the chained sequences of the genes ITS, EF and RPB2 of 8 *Fusarium* spp. Isolations (in bold) representative of 29 obtained from watermelon plants with wilting and root rot. Bootstrap of 1000 replications; external group: *Neofusicoccum parvum*.



**Cuadro 2. Identidad, localización y números de accesoión de secuencias obtenidas en el presente estudio.**  
**Table 2. Identity, location and accession numbers of sequences obtained in this study.**

Identidad	Nombre del aislado	Sitio	Número de accesoión en el GenBank		
			ITS	EF	RPB2
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG10	CH2	KX583230	KY514171	MF939148
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG11	CH1	KX583231	KY514185	MF939149
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG14*	CH2	KX583232	KY514172	KY637066
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG36	CH2	KX583233	KY514173	MF939150
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG43*	CH1	KX583234	MF939167	KY637067
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG44*	CH1	KX583235	KY514176	KY637068
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG45	CH1	KX583236	KY514177	MF939151
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG46	CH1	KX583237	KY514187	MF939152
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG48	CH1	KX583238	KY514178	MF939153
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG49	CH1	KX583239	KY514179	MF939154
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG50	CH1	KX583240	KY514180	MF939155
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG51	CH1	KX583241	KY514181	MF939156
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG52	CH1	KX583242	KY514182	MF939157
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG53	CH1	KX583243	KY514183	MF939158
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG54	CH1	KX583244	KY514184	MF939159
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG30	CH1	KX583245	KY514186	MF939160
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG37	CH2	KX583246	KY514174	MF939161
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG29	CH1	KX583247	MF939168	MF939162
<i>F. falciforme</i> (FSSC)	FsDAG40*	VG1	KX583248	KY514175	KY637065
<i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) <sup>†</sup>	FbDAG41	VG1	KX583249	MF939166	MF939163
<i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) <sup>†</sup>	FbDAG67*	CH1	KX583250	KY514170	KY637062
<i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) <sup>†</sup>	FbDAG8*	CH1	KX583251	KY514169	KY637061
<i>F. brachyigibbosum</i> (FSSC) <sup>†</sup>	FbDAG9	CH2	KX583252	MF939165	MF939164
<i>F. oxysporum</i> f. sp. niveum (FOSC)	FoDAG38*	VG2	KX583253	KY514188	KY637063
<i>F. oxysporum</i> f. sp. niveum (FOSC)	FoDAG39*	VG1	KX583254	KY514189	KY637064
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-F	CeDAG3*	CH2	MF804912	-	KY637071
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-F	CeDAG5*	VG2	KX583256	-	KY637074
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-F	CeDAG12*	CH2	KX583257	-	KY637072
<i>Ceratobasidium</i> sp. AG-F	CeDAG19*	VG2	KX583258	-	KY637073
<i>Ceratobasidium</i> sp.	CeDAG17	CH1	MF804910	-	MF804913
<i>Ceratobasidium</i> sp.	CeDAG22	CH2	KX583259	-	-
<i>Ceratobasidium</i> sp.	CeDAG23	CH2	KX583260	-	-
<i>T. praticola</i> = <i>R. solani</i> AG-4	RhDAG18*	CH2	MF804911	-	MF804914
<i>Thanatephorus</i> sp.	RhDAG20*	VG1	KX583262	-	KY637069
<i>Thanatephorus</i> sp.	RhDAG21*	VG1	KX583263	-	KY637070

\*= Aislados considerados en el análisis filogenético. FSSC= *Fusarium solani* Species Complex. FSSC<sup>†</sup>= *Fusarium sambucinum* Species Complex. FOSSC= *Fusarium oxysporum* Species Complex. CH1= Costa de Hermosillo1, CH2= Costa de Hermosillo2, VG1= Valle de Guaymas1, VG2= Valle de Guaymas. AG=Grupo anastomósico. - = sin dato / \* = Isolations considered in the phylogenetic analysis. FSSC= *Fusarium solani* Species Complex. FSSC<sup>†</sup>= *Fusarium sambucinum* Species Complex. FOSSC= *Fusarium oxysporum* Species Complex. CH1= Coast of Hermosillo1, CH2= Coast of Hermosillo2, VG1= Valley of Guaymas1, VG2= Valley of Guaymas. AG= Anastomosis group. - = Without data.

**Pruebas de patogenicidad:** La aparición de síntomas en las plantas ocurrió después de 14 días de su inoculación, en forma de lesiones en la raíz y base del tallo. Todos los aislados y sus combinaciones

analyses have revealed that each *formae speciales* belongs to a biologically and phylogenetically different species (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998). *F. falciforme* has been reported as a causal



causaron la muerte de las plantas después de 21 días. El Cuadro 3 muestra el porcentaje de raíces infectadas en cada tratamiento. Las plantas testigo no presentaron síntomas.

## DISCUSIÓN

Aun cuando el estado de Sonora es el principal productor de sandía en México, no se tienen reportes formales acerca de los hongos asociados a la pudrición de raíz. Los datos patológicos en esta investigación demuestran que individualmente o en conjunto, al menos cinco especies diferentes de hongos causan pudrición radicular y eventualmente la muerte de plantas de sandía antes de alcanzar su madurez fisiológica, al momento de la formación y desarrollo de frutos. Las características de las colonias, la morfología, la tinción de núcleos y el análisis filogenético de secuencias permitió identificar dos especies de la familia Ceratobasidiaceae: *Rhizoctonia solani* y *Ceratobasidium* sp. y tres del género *Fusarium*: *F. falciforme*, *F. oxysporum* y *F. brachygibbosum*, lo que demuestra que hay una comunidad diversa de hongos causando pudrición de raíz en sandía cultivada en la costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas, Sonora.

La especie predominantemente encontrada fue *F. falciforme*, con 25 aislados provenientes de tres campos de los dos sitios muestreados. Inicialmente, este hongo fue identificado como la morfoespecie politépica *F. solani*. Con base en el análisis filogenético concatenado de las regiones ITS, TEF-1 $\alpha$  y RPB2 usando MV se forma un clado separado dentro del *Fusarium solani* Species Complex (FSSC). Este complejo agrupa por lo menos a 60 diferentes especies que, por similitud en la morfología de sus conidias, son llamadas especies crípticas. Cuentan con un amplio rango de hospederas y han sido subdivididas en *formae speciales*, dependiendo de la

**Cuadro 3. Porcentaje de raíces infectadas en las pruebas de patogenicidad.**  
**Table 3. Percentage of infected roots in the pathogenicity tests.**

Tratamiento	SS-7187 IIQ F1	Precious Petit
Testigo	0	0
<i>F. solani</i>	23	66
<i>F. oxysporum</i>	71	75
<i>F. brachygibbosum</i>	87	100
<i>Rhizoctonia solani</i>	54	84
<i>Ceratobasidium</i>	48	100
<i>F. solani</i> + <i>F. brachygibbosum</i>	55	100
<i>F. oxysporum</i> + <i>F. brachygibbosum</i>	55	100
<i>R. solani</i> + <i>Ceratobasidium</i>	71	100
<i>F. solani</i> + <i>Ceratobasidium</i>	40	80
<i>F. oxysporum</i> + <i>Ceratobasidium</i>	100	100

agent of wilting and root rot in lima bean plants and chickpea in Brazil (Sousa *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2016).

Five *F. brachygibbosum* isolations belonging to *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSSC) were identified in three sampling sites. The characteristics of the colonies coincide with the first description published (Padwick, 1945), they present abundant white to pink aerial mycelia white to amber sclerotia of up to 2.0 mm in diameter, oval or fusiform conidia, hyperbolically curved macroconidia, terminal or alternated chlamydospores, single or in chain, generally unicellular. As a preliminary product of this investigation, *F. brachygibbosum* was reported for the first time as a pathogenic agent, causing this wilting in watermelon seeds (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). It has recently been recorded as a causal agent of rotting in the stem of maize plants (Shan *et al.*, 2017), wilting and regressive death in *Euphorbia larica* and olive trees (Al-Mahmooli *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2017) and of rotting and cankers in almond and chestnut trees (Stack *et al.*, 2017; Marek *et al.*, 2013).



especificidad al hospedero (O'Donnell *et al.*, 2015). Análisis filogenéticos recientes han revelado que cada *formae speciale* corresponde a una especie, biológica y filogenéticamente distinta (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998). *F. falciforme* ha sido reportado como agente causal de marchitamiento y pudrición de raíz en frijol lima y garbanzo en Brasil (Sousa *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2016).

Se identificaron cinco aislados de *F. brachygibbosum* perteneciente a *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSSC) en tres sitios de muestreo. Las características de las colonias coinciden con la primera descripción publicada (Padwick, 1945), presenta micelio aéreo abundante de blanco a rosa, esclerocios de blanco a ámbar de hasta 2.0 mm de diámetro, conidias ovoides a fusiformes, macroconidias hiperbólicamente curvadas, clamidosporas terminales o intercaladas, sencillas o en cadenas, generalmente de una célula. Como producto preliminar de esta investigación, *F. brachygibbosum* fue reportado por primera vez como agente patógeno, causante de marchitez en plantas de sandía (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). Recientemente se ha registrado como agente causal de podredumbre del tallo del maíz (Shan *et al.*, 2017), marchitez y muerte regresiva en *Euphorbia larica* y olivo (Al-Mahmooli *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2017) y de podredumbre y canchales en almendro y nogal (Stack *et al.*, 2017; Marek *et al.*, 2013).

*F. oxysporum* f. sp. *niveum* perteneciente al *Fusarium oxysporum* Species Complex (FOSC), se aisló solamente de los campos ubicados en el Valle de Guaymas. Los miembros de FOSC causan marchitez vascular y pudrición radicular en más de 100 diferentes especies vegetales, y en base a su especificidad con el hospedero se han reportado más de 80 *formae speciale*. En ese sentido un diagnóstico certero, aún antes de que se presenten sus síntomas, es crucial para el manejo de los cultivos (López-Mondéjar *et al.*, 2012).

*F. oxysporum* f. sp. *niveum* belongs to the *Fusarium oxysporum* Species Complex (FOSC); it was only isolated from the fields located in the Valley of Guaymas. The components of FOSC cause vascular wilting and root rot in over 100 different plant species, and based on their specificity with the host, there have been reports of over 80 *formae speciale*. In this sense, an accurate diagnosis, even before symptoms appear, is crucial for the management of crops (López-Mondéjar *et al.*, 2012).

Regarding the Ceratobasidiaceae family, binuclear *Rhizoctonia* (teleomorph: *Ceratobasidium* sp.) was the species with the widest distribution, since it was isolated from all the fields sampled, and most frequently, in field No. 2 of the Coast of Hermosillo. The symptoms observed in roots and stems of infected plants were reddish-brown lesions located and slightly sunken in the base of the stem and 0.2 to 2.0 cm in length. In some cases, the discoloration presented by diseased plants affected almost 90 % of the root system (Meza-Möller *et al.*, 2014).

The phylogenetic analysis by ML showed that the isolations obtained from *Ceratobasidium* sp. belong to two different anastomosis groups: AG-A and AG-F, previously found in diseased *Ipomoea batatas* and *Arachis hypogaea* plants, respectively. The phylogenetic relations of *Rhizoctonia* fungi show consistency between the clades formed and the anastomosis groups to which they belong (González *et al.*, 2016).

It is important to point out that most of the *Ceratobasidium* sp. isolates found in this investigation belong to group AG-F, which coincides with earlier works on root rot in watermelon carried out in Arizona, U.S.A (Nischwitz *et al.*, 2013) and Italy (Aiello *et al.*, 2012). *Ceratobasidium* AG-F is also the causal agent of root rot in strawberry (Sharon *et al.*, 2007), *Tagetes erecta* (Saroj *et al.*,

En lo que respecta a la familia Ceratobasidiales, *Rhizoctonia* binucleada (teleomorfo: *Ceratobasidium* sp.) fue la especie de más amplia distribución, ya que se aisló de todos los campos muestreados, y más frecuentemente en el campo No. 2 de la Costa de Hermosillo. Los síntomas observados en raíces y tallos de plantas infectadas fueron lesiones localizadas café-rojizas y ligeramente hundidas en la base del tallo y de 0.2 a 2.0 cm de largo. En algunos casos, la decoloración presentada por las plantas enfermas afectó casi el 90 % de sistema radicular (Meza-Möller *et al.*, 2014).

El análisis filogenético mediante MV mostró que los aislados obtenidos de *Ceratobasidium* sp., corresponden a dos grupos anastomóticos distintos: AG-A y AG-F, previamente registrados en plantas enfermas de *Ipomoea batatas* y *Arachis hypogaea*, respectivamente. Se ha demostrado que las relaciones filogenéticas de hongos de *Rhizoctonia* demuestran consistencia entre los clados formados y los grupos anastomóticos a los que pertenecen (González *et al.*, 2016).

Es importante señalar que la mayoría de los aislados de *Ceratobasidium* sp. encontrados en esta investigación pertenecen al grupo AG-F, lo que coincide con trabajos previos sobre pudrición radicular en sandía realizados en Arizona, EUA (Nisenzweig *et al.*, 2013) e Italia (Aiello *et al.*, 2012). *Ceratobasidium* AG-F también es el agente causal de pudrición radicular en fresa (Sharon *et al.*, 2007), *Tagetes erecta* (Saroj *et al.*, 2013) y pistache (Alaei *et al.*, 2017).

No existe información previa acerca de la patogenicidad del grupo anastomótico AG-A en sandía, pero sí en remolacha azucarera y manzano (Wang y Wu, 2012).

Los aislados de menor frecuencia fueron los pertenecientes al género *Rhizoctonia*, que por la alta variabilidad en su distribución geográfica, morfología, especificidad de hospederas, y

2013) and pistachio (Alaei *et al.*, 2017).

There is no previous information on the pathogenicity of the anastomotic group AG-A in watermelon, but there is on sugar beet and apple trees (Wang and Wu, 2012).

The least frequent isolations belong to the genus *Rhizoctonia*, which, due to the high variability in its geographic distribution, morphology, specificity of hosts, and pathogenicity, has also been proposed as a species complex (González *et al.*, 2006). Isolation RhDAG18 obtained from site CH2 belongs to AG-4 and has been morphologically delimited as *Thanatephorus praticola* (Mordue *et al.*, 1989), which was later corroborated by the multilocus phylogenetic analysis (González *et al.*, 2016). *T. praticola* has been presented in association with *Ceratobasidium* sp. AG-F as part of a fungal complex that cause root rot and deterioration in watermelon plantations in the production stage in Italy (Aiello *et al.*, 2012).

The pathogenicity tests showed that isolated fungi are causal agents of root rot in watermelon plants. The results of the percentage of infected roots showed that both watermelon varieties evaluated are susceptible to the five pathogens identified, inoculated separately or in combinations. In this regard, Aiello *et al.* (2012) detected percentages of incidence of the disease higher than 81 % when evaluating 6 different isolations of *Ceratobasidium* from the anastomotic group AG-F.

Due to economic losses resulting from root diseases in the areas of study, direct planting in the soil has been replaced almost entirely with watermelon grafted on patterns resistant to root rot. The commonly used rootstocks in the region are hybrids between *Cucurbita maxima* x *C. moschata*, although these hybrids have shown susceptibility to root rot (López-Eliás *et al.*, 2010). Some rootstocks have shown to be susceptible to *Fusarium* in Spain, the main producer of cucurbits in Europe



patogenicidad se ha propuesto también como un complejo de especies (González *et al.*, 2006). El aislado RhDAG18 obtenido del sitio CH2 pertenece al AG-4 y ha sido delimitado morfológicamente como *Thanatephorus praticola* (Mordue *et al.*, 1989), lo que fue corroborado posteriormente por el análisis filogenético multilocus (González *et al.*, 2016). *T. praticola* se ha presentado en asociación con *Ceratobasidium* sp. AG-F como parte de un complejo de hongos que causan pudrición de raíz y declive de plantaciones de sandía en etapa de producción en Italia (Aiello *et al.*, 2012).

Las pruebas de patogenicidad demostraron que los hongos aislados son agentes causales de pudrición radicular en sandía. Los resultados del porcentaje de raíces infectadas evidenciaron que las dos variedades de sandía evaluadas son susceptibles a los cinco patógenos identificados, inoculados por separado o en combinaciones. A este respecto, Aiello *et al.* (2012) detectaron porcentajes de incidencia de la enfermedad superiores a 81 %, al evaluar 6 diferentes aislados de *Ceratobasidium* del grupo anastomósico AG-F.

Debido a las pérdidas económicas derivadas de enfermedades radiculares en las regiones estudiadas, la siembra directa en suelo ha sido sustituida casi en su totalidad por sandía injertada sobre patrones resistentes a pudrición de raíz. Los portainjertos comúnmente empleados en la región son híbridos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*, sin embargo, estos híbridos ya han mostrado susceptibilidad a pudrición de raíz (López-Eliás *et al.*, 2010). Algunos portainjertos han mostrado susceptibilidad a *Fusarium* en España, principal productor de cucurbitáceas en Europa (Armengol *et al.*, 2000). Por otro lado, la aparente resistencia a marchitez por *Fusarium* de algunas variedades comerciales de sandía, es dependiente del tipo y concentración inicial del inóculo (Martyn y McLaughlin, 1983); en ese sentido, la oportuna identificación del

(Armengol *et al.*, 2000). On the other hand, the apparent resistance to wilting by *Fusarium* of some commercial varieties of watermelon depends on the type and initial concentration of the inoculant (Martyn and McLaughlin, 1983); in this sense, the timely identification of the pathogen will help make a better choice of rootstock. Additionally, once the pathogenic species present has been accurately established, the quantification of its concentration will manage the disease better. Using the quantitative PCR (qPCR) technique, it is possible to detect up to one 1 pg of fungal DNA in plants without symptoms (Haegi *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONS

In the present study, *Fusarium falciforme* and *Thanatephorus praticola* are reported for the first time as causal agents of watermelon plants root rotting in Mexico. The Multilocus analysis corroborated *Fusarium brachygybbosum* and *Ceratobasidium* sp. identity, previously reported in the literature. This research is a first attempt at generating data that could lead to broader studies that may contribute to establish adequate control strategies for disease management in commercial watermelon plantations.

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

patógeno permitirá una mejor elección del portainjerto. Adicionalmente, una vez determinada con precisión la especie patogénica presente, la cuantificación de su concentración, permitiría un mejor manejo de la enfermedad. Mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), es posible detectar hasta 1 pg de ADN fúngico en plantas asintomáticas (Haegi *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se reporta por primera vez a *Fusarium falciforme* y *Thanatephorus praticola* como causantes de pudrición radicular en plantas de sandía en México. El análisis multilocus permitió corroborar también a *Fusarium brachygibbosum* y *Ceratobasidium* sp., previamente reportados. Esta investigación, representa un primer intento para generar información que conduzca a estudios más amplios, que permitan establecer estrategias adecuadas para el manejo de la enfermedad en plantaciones comerciales de sandía.

## LITERATURA CITADA

- Aiello D, Vitale A, Hyakumachi M and Polizzi G. 2012. Molecular characterization and pathogenicity of binucleate *Rhizoctonia* AG-F associated to the watermelon vine decline in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 134:161-165. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9973-9>
- Aloui H, Molaei S, Mahmoodi SB and Saberi-Riseh R. 2017. New Anastomosis Group F (AG-F) of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of *Pistacia vera*. *Journal of Crop Protection* 6:1-13. <https://doi.org/10.18869/modares.jep.6.1.1>
- Al-Hatmi AM, Van Den Ende AH, Stielow JB, Van Diepeningen AD, Seifert KA, McCormick W, Assabsqui R, Gräfenhan T, De Hoog GS and Levesque CA. 2016. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in *Fusarium*. *Fungal Biology* 120:231-245. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.006>
- Al-Mahmooli IH, Al-Balhi YS, Al-Sadi AM and Deadman ML. 2013. First Report of *Euphorbia larica* Dieback Caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Disease* 97:687. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0828-PDN>
- Altschuld SF, Gish W, Miller W, Meyers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amengol J, José CM, Moya MJ, Vicent A and Garcia JJ. 2000. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. *EPPO Bulletin* 30:179-183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00875.x>
- Cabral CS, Melo MP, Fonseca MEN, Boiteux LS and Reis A. 2016. A Root Rot of Chickpea caused by Isolates of the *Fusarium solani* Species Complex in Brazil. *Plant Disease* 100:2171. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0571-PDN>
- Carling DE, Kaminaga S and Brainard KA. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG2) and AG-BL. *Phytopathology* 92:43-50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.43>
- Cedeno L. 2008. Método fácil y confiable para teñir núcleos en hongos del complejo *Rhizoctonia*. *Bioagro* 20:215-219. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714153009> (Consulta, agosto 2017).
- Choi J, Park SY, Kim BR, Roh JH, Oh IS, Han SS and Lee YH. 2013. Comparative Analysis of Pathogenicity and Phylogenetic Relationship in *Magnaporthe grisea* Species Complex. *PLOS ONE* 8: e57196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057196>
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17:146-158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Food and Agriculture Organization. 2014. Estadísticas. Disponible en línea: <http://faostat3.fao.org/browse/Q-QC/S> (Consulta, junio 2017).
- Geiser DM, Aoki T, Bacon CW, Baker SE, Bhattacharyya MK, Brandt ME, Brown DW, Burgess LW, Chulze S, Coleman JJ, Correll JC, Covert SF, Crois PW, Cuomo CA, De Hoog GS, Di Pietro A, Elmer WH, Epstein L, Frandsen RJ, Freeman S, Gagkaeva T, Glenn AE, Gordon TR, Gregory NE, Hammond-Kosack KE, Hanson LE, Jimenez-Gasco M M, Kang S, Kistler HC, Kuldau GA, Leslie JF, Logrieco A, Lu G, Lysée E, Ma LJ, McCormick SP, Migheli Q, Moretti A, Munari F, O'Donnell K, Pfenning L, Ploetz RC, Proctor RH, Rehner SA, Robert VA, Rooney AP, Bin Sallik B, Scandiani MM, Scauflaire J, Short DP, Steenkamp E, Suga H, Summerell BA, Sutton DA, Thrane U, Trail F, Van Diepeningen A, Vanetten HD, Viljoen A, Waalwijk C, Ward TJ, Wingfield MJ, Xu JR, Yang XB, Yli-Mattila T and Zhang N. 2013. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103:400-408. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>
- González D, Rodríguez CM, Boekhout T, Stalpers J, Kuramae EE, Nakatani AK, Vilgalys R and Cubeta MA. 2016. Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi within the Cantharellales. *Fungal Biology* 120:603-19. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.012>
- González D. 2013. Identification, molecular characterization, and evolution of group I introns at the expansion segment D11 of 28S rDNA in *Rhizoctonia* species. *Fungal Biology* 117: 623-637. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.006>
- González D, Cubeta MA and Vilgalys R. 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and b-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40:459-470. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.022>
- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N and Belisario A. 2013. A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible



- interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology* 103:802-810. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0293-R>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Ed. Wiley-Blackwell, USA, 388p.
- López EJ, Pacheco-Ayala F, Huez-López MA, Rodríguez JC, Jiménez-León J y Garza-Ortega S. 2010. Sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) injertada sobre diferentes portainjertos de calabaza (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). *Biotecnología*. XII: 3-10. Disponible en línea: <https://biotecnologia.unison.mx/index.php/biotecnologia/view/87>
- López-Mondéjar R, Beaulieu R, Ros M and Pascual JA. 2012. SCAR-based real-time TaqMan PCR for early detection of *Fusarium oxysporum* in melon seedlings under greenhouse nursery conditions. *Crop protection* 33:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.10.009>
- Marek SM, Yaghmour MA and Bostock RM. 2013. *Fusarium* spp., *Cylindrocarpum* spp., and environmental stress in the etiology of a canker disease of cold-stored fruit and nut tree seedlings in California. *Plant Disease* 97: 259-270. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0355-RE>
- Martyn RD and McLaughlin RJ. 1983. Effects of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelons to *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Plant Disease* 67:493-495. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05\\_493.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05_493.PDF)
- Meza-Möller AC, Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho M, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SE. 2014. First report of root rot of watermelon caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 98:847. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0974-PDN>
- Mordue JEM, Currah RS and Bridge PD. 1989. An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. *Micological Research* 92:78-90. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80099-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80099-1)
- Narayanasamy P. 2011. Assessment of variability in fungal plant pathogens. Pp:245-272. In: *Microbial plant pathogens detection and disease diagnosis*. Vol. 1. Springer, Dordrecht, Netherlands. 291p. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4_4)
- Nischwitz C, Chitrampalam P and Olsen M. 2013. *Ceratobasidium* root rot: A new disease of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Arizona. *Plant Health Progress*. DOI:10.1094/PHP-2013-1125-01-BR
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:2044-2049. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/>
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJ N, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S and Geiser DM. 2013. Phylogenetic analysis of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM and Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Padwick GW. 1945. Notes on Indian fungi III. *Mycological Papers*. 12:1-15
- Posada D and Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>
- Rentería-Martínez ME, Meza-Möller AC, Guerra-Camacho M, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A and Moreno-Salazar SE. 2015. First report of watermelon wilting caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 99:729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [2015-09-10]. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index)
- Saroj A, Kumar A, Saeed ST, Samad A and Alam M. 2015. First report of *Togetes evecta* damping off caused by *Ceratobasidium* sp. from India. *Plant Disease* 97:1251. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0145-PDN>
- Shan LY, Cui WY, Zhang DD, Zhang J, Ma NN, Bao YM, Dai XF and Guo W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101:837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Sharon M, Freeman S, Kunitaga S, and Sueh B. 2007. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 117:247-265. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9091-7>
- Sharon M, Kunitaga S, Hyakumachi M, Naito S and Sueh B. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49:93-114. <https://doi.org/10.1007/s10267-007-0394-0>
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agrícola por cultivo. [2017-02-14]. <http://www.siap.gob.mx/>
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sousa ES, Melo MP, Mota JM, Sousa EMJ, Beserra JEA and Matos KS. 2017. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Disease* 101:1954. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0657-PDN>
- Sueh B, Jabaji-Hare S, Neate S, and Dijkstra G. 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands. 578p.
- Stack AJ, Yaghmour MA, Kirkpatrick SC, Gordon TR and Bostock RM. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated

- almond trees in California. *Plant Disease* 101:390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0929-PDN>
- Stielow JB, Levesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D and Robert V. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35:242-263. <http://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- Swofford DL. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en línea: [http://paup.scs.fsu.edu/Cmd\\_ref\\_v2.pdf](http://paup.scs.fsu.edu/Cmd_ref_v2.pdf)
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS and Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics Biology* 31:21-32. <https://doi.org/10.1006/jgbi.2000.1228>
- Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, Krid S, Cheff M, Kammoun S, Dammak M, Mseddi A, Gdotra R and Ali TM. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusicladium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *3 Biotech* 7:28. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0587-3>
- Wang PP and Wu XH. 2012. First report of sugar beet seedling damping-off caused by binucleate *Rhizoctonia AG-A* in China. *Plant Disease* 96:1696. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0492-PDN>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA. 345p.

## Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México

### Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México

María Eugenia Rentería-Martínez, Miguel Ángel Guerra-Camacho, Andrés Ochoa-Meza, Sergio Francisco Moreno-Salazar\*, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Carretera Hermosillo-Bahía Kino Km 21, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. Amparo del Carmen Meza-Moller, Universidad Estatal de Sonora, Avenida Ley Federal del Trabajo S/N, Colonia Apolo, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México; Juan Manuel Guzmán-Ortiz, Departamento de Investigaciones Científicas y tecnológicas, Universidad de Sonora, Luis Donaldo Colosio S/N, Colonia Centro, Hermosillo, Sonora, CP. 83000, México. \*Autor para correspondencia: [sergio.moreno@unison.mx](mailto:sergio.moreno@unison.mx)

Recibido: 04 de Agosto, 2018. Aceptado: 21 de Septiembre, 2018.

Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Meza-Moller AC and Guzmán-Ortiz JM. 2018. Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-1

Primera publicación DOI: 18 Octubre, 2018.

First publication DOI: October 18, 2018.

**Resumen.** Recientemente se ha identificado a *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* como causantes de marchitez y muerte en plantas de sandía en Sonora, México. Debido a la escasa información morfológica acerca de *F. brachygibbosum* y con el fin de establecer las

**Abstract.** *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* have been recently identified as the cause of wilt and death in watermelon plants in Sonora, Mexico. Because of the scarce morphological information about *F. brachygibbosum* and in order to establish the distinctive macroscopic and microscopic characteristics among the species, the present study described four morphotypes of *F. brachygibbosum* and their comparison with three of *F. falciforme* and two of *F. oxysporum*. The categorization of morphotypes was based on the form of growth, mycelial tonalities and color developed in potato dextrose agar from 32 pathogenic *Fusarium* isolates in watermelon. The four morphotypes of *F. brachygibbosum* presented thick walled single and double chlamydospores, intercalary and terminal. Short monophialides and scarce polyphialides; macroconidia with apical slightly hook shaped cells



características macroscópicas y microscópicas distintivas entre las especies, en el presente trabajo se realizó la descripción de cuatro morfotipos *F. brachygibbosum* y su comparación con tres de *F. falciforme* y dos de *F. oxysporum*. La categorización de los morfotipos se realizó, con base en la forma de crecimiento, tonalidades del micelio y el color desarrollado en agar-dextrosa-papa, a partir de 32 aislados de *Fusarium* patogénicos en sandía. Los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* presentaron clamidosporas sencillas o dobles, de pared gruesa, intercalares y terminales. Monofialides cortas y escasas polifialides. Macroconidios con células apicales en ligera forma de gancho y células basales con forma típica o ligera forma de pie. El mayor grosor de paredes fue distintivo en las clamidosporas de *F. brachygibbosum*. La morfología de los macroconidios fue diferente en las tres especies. Una característica distintiva en los morfotipos de *F. falciforme* fueron las monofialides largas y delgadas; mientras que en los de *F. oxysporum* fue la ausencia de septos en los microconidios. El tamaño de los macroconidios y microconidios fue significativamente diferente entre los morfotipos, pero no entre las especies.

**Palabras clave:** marchitez, macroconidios, microconidios, clamidosporas, polifialides.

El género *Fusarium* comprende muchas especies de hongos filamentosos ampliamente distribuidos a nivel mundial. Varios miembros de este género pueden causar enfermedades en plantas, animales y humanos. Diferentes especies de *Fusarium* causan enfermedades en algunos de los más importantes cultivos, como arroz, maíz, trigo, frijol, soya, calabaza, melón y sandía, entre otros (Smith, 2007).

El cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) genera alrededor de 300 millones de dólares anuales

and basal cells with a typical or slight foot shape. The greater thickness of the walls was distinctive in chlamydospores of *F. brachygibbosum*. The morphology of the macroconidia was different in the three species. A distinctive characteristic of *F. falciforme* morphotypes was the long and thin monophialides while in those of *F. oxysporum* was the absence of septa in the microconidia. The size of macroconidia and microconidia was significantly different among the morphotypes but not within the species.

**Key words:** wilting, macroconidia, microconidia, chlamydospores, polyphialides.

The genus *Fusarium* includes many filamentous fungi that are widely distributed all over the world. Several members of this genus cause diseases in plants, animals and humans. Different *Fusarium* species cause diseases in some of the most important crops, such as rice, maize, wheat, beans, soybeans, squash, melon and watermelon, among others (Smith, 2007).

Watermelon (*Citrullus lanatus*) production in Mexico generates around US \$300 million per year and the main watermelon producer is the state of Sonora. The economic benefits of watermelon cropping in Sonora exceed US \$30 million a year (SIAP, 2017). However, watermelon fields in the state are frequently threatened by several fungal diseases.

Most research studies point to *Fusarium oxysporum* and *F. solani* as the main causes of death of watermelon plants by wilt and root rot. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* is considered the most important of the fungi that cause wilt in watermelon crops worldwide (Egel and Martyn, 2007; Zhou et al., 2010; Turóczy et al., 2011; Zhang et al., 2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (races 1 and 2) is another species that causes



en México y el estado de Sonora es su principal productor. La derrama económica por el cultivo de sandía en Sonora supera los 30 millones de dólares al año (SIAP, 2017). Sin embargo, frecuentemente los plantíos de sandía, en este estado, se ven amenazados por diversas enfermedades de origen fúngico.

La mayoría de los trabajos señalan a *Fusarium oxysporum* y *F. solani* como los principales responsables de la muerte por marchitez y pudrición de raíz, en plantas de sandía. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* es considerado el más importante de los hongos causantes de marchitez en los cultivos de sandía alrededor del mundo (Egel y Martyn, 2007; Zhou *et al.*, 2010; Turóczy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, razas 1 y 2, es otra especie causante de marchitez en plantas de sandía, aunque su prevalencia es menos reconocida. La raza 2 solamente afecta a los frutos causando una pudrición seca; la raza 1 afecta tanto a frutos maduros como a plantas causando pudrición seca y pudrición cortical del tallo, respectivamente (Boughalleb *et al.*, 2005; Mehl y Epstein, 2007).

Recientemente, Rentería-Martínez *et al.* (2018), identificaron a *Fusarium falciforme* (perteneciente al complejo de especies de *Fusarium solani*), *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*, además de *Rhizoctonia solani* y *Ceratobasidium* sp., como los hongos asociados a marchitez y pudrición de raíz en plantas de sandía cultivadas en Sonora, México.

*Fusarium brachygibbosum* ha sido identificado como patógeno en leguminosas (Tan *et al.*, 2011), en plantas de palma datilera (Al-Sadi *et al.*, 2012), *Euphorbia larica* (Al-Mahmooli *et al.*, 2013), *Nerium oleander* (Mirhosseini *et al.*, 2014), *Striga hermonthica* (Rna *et al.*, 2014), plantas medicinales (Gashgari *et al.*, 2016), almendro (Stack *et al.*, 2017), maíz (Shan *et al.*, 2017), olivo (Trabelsi *et al.*, 2017), girasol (Xia *et al.*, 2018) y remolacha azucarera (Cao *et al.*, 2018). En estos reportes, la

wilt in watermelon plants, although with lower prevalence. Race 2 affects only watermelon fruit, in which it causes dry rot, but race 1 affects both mature fruits and plants, in which it causes dry rot and cortical stem rot, respectively (Boughalleb *et al.*, 2005; Mehl and Epstein, 2007).

Recently, Rentería-Martínez *et al.* (2018) identified *Fusarium falciforme* (belonging to *Fusarium solani* species complex), *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*, as well as *Rhizoctonia solani* and *Ceratobasidium* sp., as fungi associated with wilt and root rot in watermelon plants grown in Sonora, Mexico.

*Fusarium brachygibbosum* has been identified as a pathogen in legumes (Tan *et al.*, 2011), date palm plants (Al-Sadi *et al.*, 2012), *Euphorbia larica* (Al-Mahmooli *et al.*, 2013), *Nerium oleander* (Mirhosseini *et al.*, 2014), *Striga hermonthica* (Rna *et al.*, 2014), medicinal plants (Gashgari *et al.*, 2016), almond trees (Stack *et al.*, 2017), maize (Shan *et al.*, 2017), olive trees (Trabelsi *et al.*, 2017), sunflower (Xia *et al.*, 2018) and sugar beet (Cao *et al.*, 2018). According to these reports, *F. brachygibbosum* was identified through molecular techniques, and only a brief morphological description was included using the morphotype reported by Padwick (1945) as a reference in all the cases, but without considering the diversity of morphotypes of the specie.

According to Leslie *et al.* (2001), the different shapes of the macroconidia are essential for identifying many *Fusarium* species, but there are other useful traits that could be used to distinguish the species of a genus. Traditionally, *Fusarium* species have been identified based on their morphological characteristics, such as the shape and size of macro- and microconidia, and the absence or presence and shape of chlamydoconidia. The appearance, shape and pigmentation of the colonies, as well as their growth rates in different

identificación de la especie se realizó mediante técnicas moleculares y solo se incluyó una somera descripción morfológica, tomando como referencia, en todos los casos, al morfotipo reportado por Padwick (1945), sin considerar la diversidad de morfotipos existente en la especie.

De acuerdo con Leslie *et al.* (2001), las diferencias en la forma de los macroconidios son fundamentales para la identificación de muchas especies de *Fusarium*, pero además hay otros caracteres útiles para diferenciar entre las especies de un género. Tradicionalmente la identificación de las especies de *Fusarium* se realiza en base a características morfológicas, tales como: forma y tamaño de macro y microconidios, la ausencia o presencia y forma de las clamidosporas. La apariencia, forma y pigmentación de las colonias, así como las velocidades de crecimiento en diferentes medios, también son tomadas en consideración (Leslie y Summerell, 2006; Ismail *et al.*, 2015). Esto resalta la importancia de conocer que caracteres morfológicos son los que pueden ayudar en la identificación de las especies de *Fusarium* causantes de muerte en plantas de sandía en Sonora.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar y comparar la variabilidad morfológica entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* encontrados como agentes causales de marchitez en plantas de sandía cultivadas en Sonora, México, con el fin de establecer las características macroscópicas y microscópicas distintivas entre las especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los sitios y la metodología de muestreo de las plantas sintomáticas, el aislamiento y obtención de cultivos monospóricos, la extracción de ADN, la identificación molecular y las pruebas patogenicidad

media, are also taken into consideration (Leslie and Summerell, 2006; Ismail *et al.*, 2015). These findings highlight the importance of knowing which morphological traits can help identify the *Fusarium* species that cause watermelon plants to die in Sonora.

Based on the above, the objective of this study was to analyze and compare the morphological variability among *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes identified as being the causal agents of wilt in watermelon plants grown in Sonora, Mexico, in order to establish the distinctive macro- and microscopic characteristics of these species.

## MATERIALS AND METHODS

The sites and methodology used to sample plants showing symptoms, isolation, monosporic cultures, DNA extraction, as well as to do the molecular identification and conduct pathogenicity tests on the isolates following Koch's postulates, were described and published by Renteria-Martinez *et al.* (2018). A total of 25 *Fusarium falciforme* isolates, five *F. brachygibbosum* isolates, and two *F. oxysporum* isolates were identified.

**Morphotype classification.** Morphotypes of each species were established based on the type of growth, mycelium color and culture medium pigmentation. Assessments were conducted on one isolate that was representative of each morphotype.

### **Morphology and growth rate of the colonies.**

The macroscopic characteristics of the colonies (mycelium growth rate, color of the colony and pigmentation) were evaluated in potato-dextrose-agar (PDA) medium. The growth rate of each isolate was determined by taking a disk 8 mm



de los aislados en cumplimiento con los postulados de Koch se describieron y publicaron por Rentería-Martínez *et al.* (2018). En total se identificaron 25 aislados de *Fusarium falciforme*, cinco de *F. brachygibbosum* y dos *F. oxysporum*.

**Clasificación de morfotipos.** Los morfotipos de cada especie se establecieron con base en el tipo de crecimiento, coloración del micelio y pigmentación del medio de cultivo. Las determinaciones se realizaron en un aislado representativo de cada morfotipo.

**Morfología y velocidad de crecimiento de las colonias.** Las características macroscópicas de las colonias (tasa de crecimiento del micelio, color de la colonia y pigmentación) se evaluaron en medio PDA. La tasa de crecimiento de cada aislado se determinó tomando un disco de 8 mm de diámetro de colonias de 7 días de desarrollo en PDA y colocándolo al centro de otra placa con PDA. Las placas se incubaron a 27 °C y se midió diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares hasta que el cultivo cubrió completamente la placa. Se evaluaron cinco repeticiones por cada aislado. Se registró la morfología de las colonias y la pigmentación aérea del micelio (Nelson *et al.*, 1983).

**Análisis de las características microscópicas.** Los diferentes morfotipos se cultivaron en agar hojas de clavel (CLA), de acuerdo con Fisher *et al.* (1982). Para promover la formación de clamidosporas, se utilizó agar de suelo (SA), según Klotz *et al.* (1988). Los cultivos en CLA y SA se incubaron en las mismas condiciones: 25 °C, 12 h luz /12 h oscuridad durante dos semanas.

Las preparaciones microscópicas en portaobjetos se examinaron con un microscopio de luz compuesto (VELAB™). Para observar y medir el tamaño de los conidios, filídes y clamidosporas

in diameter containing 7-day-old colonies in PDA and placing it in the middle of another dish containing PDA. The dishes were incubated at 27 °C and the colony's diameter was measured in two perpendicular directions every day until the dish was completely covered by the culture. Five replicates of each isolate were evaluated. The morphology of the colonies and the aerial pigmentation of the mycelium were recorded (Nelson *et al.*, 1983).

**Analysis of microscopic characteristics.** The different morphotypes were cultured in carnation leaf agar (CLA), according to the method of Fisher *et al.* (1982). To promote the formation of chlamydospores, soil-agar (SA) was used, according to the method of Klotz *et al.* (1988). The CLA and SA cultures were incubated under the same conditions: 25 °C, 12 h light/12 h darkness for two weeks.

Microscopic preparations on slides were observed using a compound light microscope (VELAB™). To observe and measure the size of the conidia, phialides and chlamydospores, pictures were taken at 40X and 100X, which were then analyzed using TSVIEW software, version 6.2.4.5. The length and width of 50 macroconidia and 50 microconidia randomly selected from each isolate were measured.

**Statistical analysis.** Data on macroconidial and microconidial length and width were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and media separation using Tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ) and the JMP program v5.0.1a.

## RESULTS

**Morphotype classification and growth rate.** The 25 *F. falciforme* isolates were grouped in three

se tomaron fotografías a 40X y 100X, luego se analizaron utilizando el software TSVIEW, versión 6.2.4.5. Se midió la longitud y el ancho de cincuenta macroconidios y cincuenta microconidios seleccionados al azar de cada aislado.

**Análisis estadístico.** Los datos de longitud y ancho de macroconidios y microconidios fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ), utilizando el programa JMP v5.0.1a.

## RESULTADOS

**Clasificación de morfotipos y velocidad de crecimiento.** Los 25 aislados de *F. falciforme* se agruparon en tres morfotipos (Ff-14, Ff-49 y Ff-50), los cinco aislados de *F. brachygibbosum* en cuatro (Fb-8, Fb-9, Fb-41 y Fb-67) y los dos de *F. oxysporum* en uno (Fo-38). En el Cuadro 1 se presentan las velocidades de crecimiento y las características macroscópicas observadas en los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* en PDA. La Figura 1 evidencia la presencia de los cuatro morfotipos patogénicos de *F. brachygibbosum*, encontrados en los campos de sandía en Sonora.

**Características microscópicas.** En el Cuadro 2 se resume la morfología de las clamidosporas y las células conidiógenas observada en los aislados representativos de cada morfotipo en las tres especies. En todos los casos se observaron clamidosporas redondas intercalares y terminales, principalmente sencillas y dobles; sin embargo, el mayor grosor en la pared de las clamidosporas de los morfotipos de *F. brachygibbosum* (Figura 2A) parece ser una característica que lo diferencia de *F. falciforme* y *F. oxysporum* (Figura 2B-C). En lo referente a las células conidiógenas, los morfotipos de *F. falciforme*

morfotipos (Ff-14, Ff-49 and Ff-50), the five *F. brachygibbosum* isolates in four morphotypes (Fb-8, Fb-9, Fb-41 and Fb-67), and the two *F. oxysporum* isolates in one morphotype (Fo-38). Table 1 shows the growth rates and macroscopic characteristics observed in *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes grown in PDA. Figure 1 shows the presence of the four *F. brachygibbosum* pathogenic morphotypes found in watermelon fields in Sonora.

**Microscopic characteristics.** Table 2 summarizes the chlamydo-spores morphology and conidiogenic cells observed in isolates representative of each morphotype in the three species. In all cases, spherical, intercalary and terminal chlamydo-spores were observed, mainly singly and in pairs; however, the walls of the chlamydo-spores of *F. brachygibbosum* morphotypes (Figure 2A) are thicker, which seems to be a characteristic that distinguishes them from those of *F. falciforme* and *F. oxysporum* (Figure 2B-C). Regarding conidiogenic cells, *F. falciforme* morphotypes (Figure 2B) differ from the others because their monophialides are longer and thinner.

Table 3 shows a morphological description of the macroconidia and microconidia of isolates that are representative of each morphotype. There were some differences among the three species. The four *F. brachygibbosum* morphotypes had thin, straight macroconidia with three to five septa, the cells in the middle were slightly wide and the intermediate cells were curved towards the basal part. The apical cells were slightly hook-shaped, while the basal cells had a typical shape or were slightly foot-shaped (Figure 3). *F. falciforme* macroconidia were wide and straight, or slightly curved, but the ventral and dorsal planes were parallel along most of their length, the apical cells were rounded, while the basal cells were straight and cylindrical with



Cuadro 1. Velocidad de crecimiento en PDA y características macroscópicas de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía.Table 1. Growth rate on PDA and macroscopic characteristics of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes pathogenic to watermelon.

|                          | Velocidad de crecimiento <sup>a</sup> | Morfología de las colonias                                                                                                     | Pigmentación <sup>b</sup>                                                                                                 |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                       |                                                                                                                                |                                                                                                                           |
| Fb-8                     | 4.9                                   | Micelio aéreo, veloso de color blanco, tornándose amarillo y rosa con esporoquios amarillos después de 2 semanas.              | Café claro, con manchas café oscuro alrededor de los esporoquios.                                                         |
| Fb-9                     | 4.2                                   | Micelio aéreo, veloso de color amarillo, con esporoquios color café después de 2 semanas.                                      | Amarillo-naranja con el centro café rojizo en forma de estrella. Con manchas café oscuras alrededor de los esporoquios.   |
| Fb-41                    | 4.8                                   | Micelio aéreo, veloso de color café claro, con esporoquios café después de 2 semanas.                                          | Centro café oscuro con anillos concéntricos menos café hacia afuera. Con manchas café claro alrededor de los esporoquios. |
| Fb-67                    | 4.6                                   | Micelio aéreo, veloso de color blanco al inicio. Tornándose rosa con el desarrollo esporoquios amarillos después de 2 semanas. | Rojo intenso brillante en todo el fondo de la caja.                                                                       |
| <i>F. falciforme</i>     |                                       |                                                                                                                                |                                                                                                                           |
| Ff-14                    | 4.1                                   | Micelio postrado de color beige. Crecimiento en anillos concéntricos, sin formación de esporoquios.                            | Café claro con halos café oscuros debido al crecimiento en forma de anillo.                                               |
| Ff-49                    | 3.6                                   | Micelio postrado de color beige, sin formación de esporoquios.                                                                 | Café claro.                                                                                                               |
| Ff-50                    | 3.9                                   | Micelio postrado de color blanco, sin formación de esporoquios.                                                                | Beige muy claro, cubriendo toda la caja.                                                                                  |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                       |                                                                                                                                |                                                                                                                           |
| Fo-38                    | 3.4                                   | Micelio veloso de color blanco, el cual se torna púrpura después de una semana. Sin formación de esporoquios.                  | Púrpura en toda la caja.                                                                                                  |

<sup>a</sup> mm/día / mm/day.<sup>b</sup> Fondo de la caja Petri / Bottom of the Petri dish.

(Figura 2B) se distinguen de los demás, por tener monofálides más largas y delgadas.

En el Cuadro 3 se presenta la descripción morfológica de los macroconidios y microconidios de los aislados representativos de cada morfotipo. Se observaron algunas diferencias entre las tres especies. Los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* presentaron macroconidios delgados y rectos, con tres a cinco septos, las células del centro ligeramen-

a barely trimmed or round end (Figure 4B). The shape of *F. oxysporum* macroconidia was similar to that of *F. brachygibbosum* macroconidia, but their basal cells were pointed and lower in number, with a barely visible foot shape (Figure 4C).

*F. brachygibbosum* microconidia were oval, sometimes ovoid, usually with one septum, rarely with two or none. *F. oxysporum* microconidia were elliptical, oval and kidney-shaped with no septa. *F.*

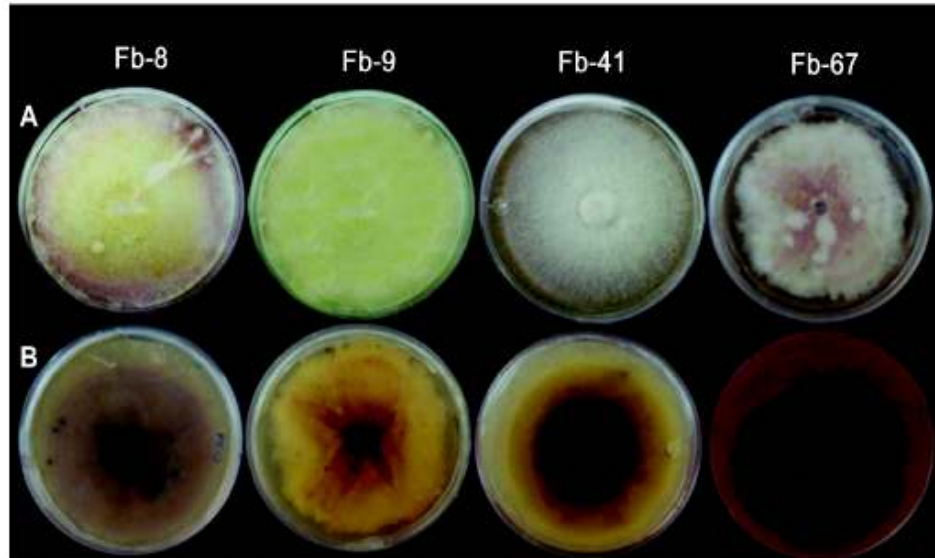


Figura 1. Características morfológicas de las colonias de los 4 morfotipos de *Fusarium brachygibbosum* en PDA. A = Frente B = Fondo

Figure 1. Morphological characteristics of colonies of four *Fusarium brachygibbosum* morphotypes grown in PDA. A = Front B = bottom.

Cuadro 2. Morfología de clamidosporas y células conidiógenas en los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía, desarrollados en CLA.

Table 2. Morphology of chlamydospores and conidiogenous cells *F. brachygibbosum* morphotypes, and isolates that were representative of *F. falciforme* and *F. oxysporum* grown in CLA.

|                          | Forma de las clamidosporas                                                      | Tipo de células conidiógenas                                  |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                                                                 |                                                               |
| Fb-8                     | Dobles, Intercalares y terminales. Pared gruesa.                                | Monofialides cortas. Algunas polifialides cortas.             |
| Fb-9                     | Sencillas, Intercalares. Pared gruesa.                                          | Monofialides cortas. Algunas polifialides cortas.             |
| Fb-41                    | Sencillas, Intercalares. Pared gruesa.                                          | Monofialides cortas. Algunas polifialides cortas.             |
| Fb-67                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared gruesa.                    | Monofialides cortas. Algunas polifialides cortas.             |
| <i>F. falciforme</i>     |                                                                                 |                                                               |
| Ff-14                    | Sencillas, dobles y en cadena. Intercalares y terminales. Pared mediana.        | Monofialides muy largas y algunas cortas. Pocas polifialides. |
| Ff-49                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared de grosor medio o delgado. | Monofialides muy largas y algunas cortas. Pocas polifialides. |
| Ff-50                    | Sencillas y dobles. Terminales. Pared de grosor medio o delgado.                | Monofialides muy largas abundantes. Pocas polifialides.       |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                                                                 |                                                               |
| Fo-38                    | Sencillas y dobles. Intercalares y terminales. Pared de grosor medio o delgado. | Monofialides cortas y escasa presencia de polifialides.       |

te anchas centro y las intermedias curvadas hacia la parte basal. Las células apicales tuvieron ligera forma de gancho y las células basales la forma típica o ligera forma de pie (Figura 3). Los macroconidios de *F. falciforme* fueron anchos y rectos

*falciforme* had oval, ellipsoid and kidney-shaped microconidia with a truncated basal part, and some of them were pyriform and fusiform with one or two septa, or none (Table 3, Figure 4 D-F). Due to shape variability, it was not possible to observe

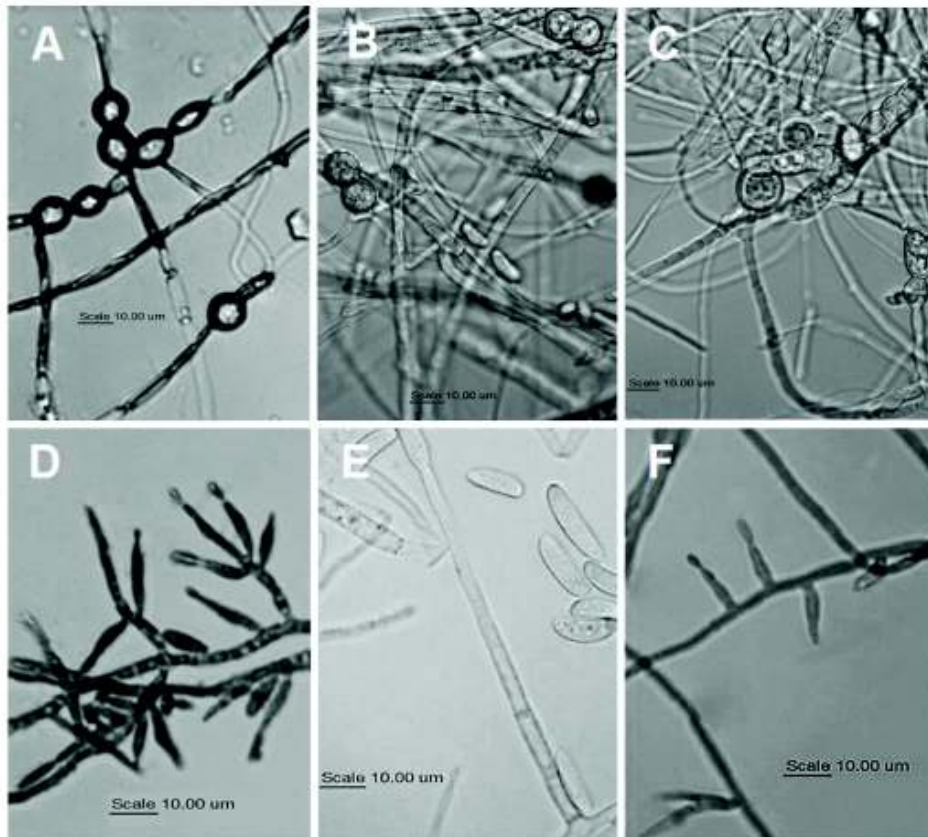


Figura 2. A-C: Morfología de clamidosporas. A - *F. brachygibbosum*, B - *F. falciforme* y C - *F. oxysporum*. D-F: Morfología de células conidiógenas. D = polifialides y monofialides de *F. brachygibbosum*, E = monofialide de *F. falciforme* y F = monofialides de *F. oxysporum*.

Figure 2. A-C: Morphology of chlamydospores of A = *F. brachygibbosum*; B = *F. falciforme*; and C = *F. oxysporum*. D-F: Morphology of conidiogenous cells: D = polyphialides and monophialides of *F. brachygibbosum*, E = monophialides of *F. falciforme*, and F = monophialides of *F. oxysporum*.



o ligeramente curvados, pero con el plano ventral y dorsal paralelos en la mayor parte de su longitud, sus células apicales fueron redondeadas y las basales rectas y cilíndricas con el extremo apenas

differences among macroconidia from different species, and only the absence of septa in all *F. oxysporum* (Figure 4F) microconidia observed seems to be a distinctive trait.

**Cuadro 3. Morfología de macroconidios y microconidios de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenicos en sandía, desarrollados en CLA.**

**Table 3. Morphology of macroconidia and microconidia of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* morphotypes pathogenic to watermelon grown in CLA.**

|                          | Forma de macroconidios                                                                                                                                                                                                                                   | Forma de microconidios                                                                                 |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>F. brachygibbosum</i> |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Fb-8                     | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con ligera forma de pie. Tres o cuatro septos.                                            | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-9                     | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con típica forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-41                    | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con típica forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| Fb-67                    | Delgadas, largas y rectas. Células centrales ligeramente anchas y curvadas hacia la parte basal. Células apicales con ligera forma de gancho y células basales con ligera forma de pie. Tres a cinco septos.                                             | Ovales y algunas ovoides. Con uno y escasamente con ninguno o con dos septos.                          |
| <i>F. falciforme</i>     |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Ff-14                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados o redondeados. Con tres a seis septos. | Ovales, elipsoides, reniformes y fusiformes. Con la parte basal truncada. Con ningún o con un septo.   |
| Ff-49                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados. Con tres a seis septos.               | Ovales, elipsoides y reniformes. Con cero, uno o dos septos.                                           |
| Ff-50                    | Anchas y rectas. Ligeramente curvadas con el plano ventral y dorsal paralelo en la mayor parte de su longitud. Células apicales redondeadas. Células basales rectas y cilíndricas, con extremos apenas recortados. Con cuatro a seis septos.             | Ovales, elipsoides, reniformes y ocasionalmente piriformes. Con cero, uno y ocasionalmente dos septos. |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                        |
| Fo-38                    | Cortas a medianas y esbeltas. Rectas o ligeramente curvadas. Células apicales cónicas con ligera forma de gancho y células basales en forma puntiaguda. Tres o cuatro septos.                                                                            | Ovales típicas, elípticas y forma de riñón. Sin septos.                                                |



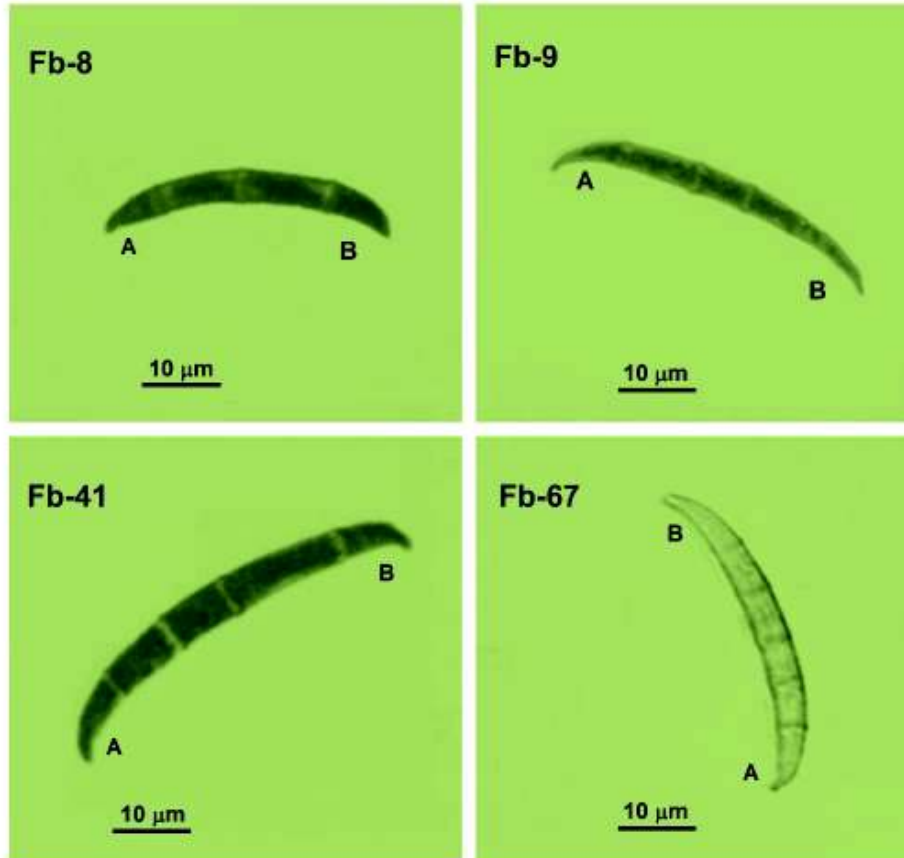
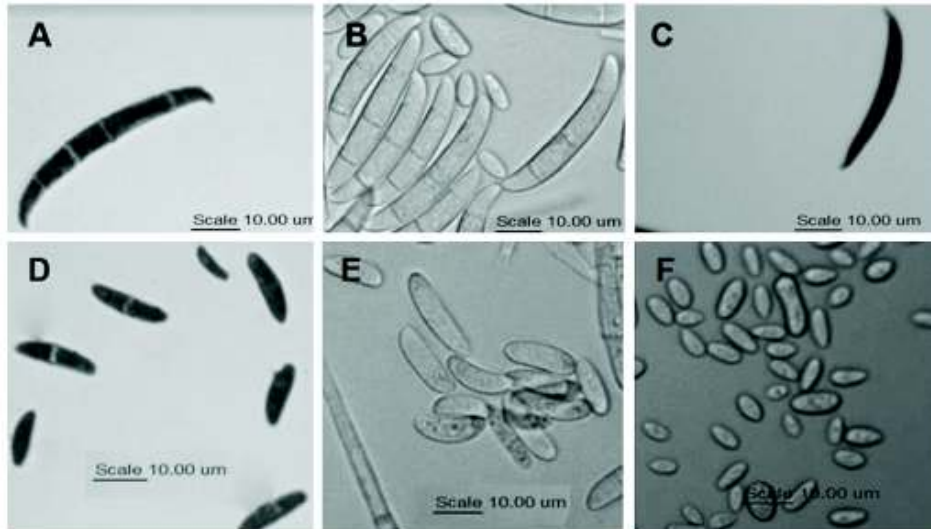


Figura 3. Morfología de las macroconidios de los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum*. A = células apicales con forma ligera de gancho y B = células basales con ligera forma de pie (Fb-8 y Fb-67) y típica forma de pie (Fb-9 y FB-41).  
Figure 3. Morphology of macroconidia of four *F. brachygibbosum* morphotypes. A = slightly hook-shaped apical cells; and B = slightly foot-shaped basal cells (Fb-8 and Fb-67) and typical foot-shaped cells (Fb-9 and FB-41).

recortado o redondeado (Figura 4B). La forma de los macroconidios de *F. oxysporum* fue parecida a la de *F. brachygibbosum*, pero con células basales puntiagudas y en menor cantidad con forma de pie apenas visible (Figura 4C).

Table 4 shows the average length and width of the macroconidia, according to the number of septa and the average of 50 cells. The statistical analysis detected significant differences in the average length and width of the macroconidia among the isolates,



**Figura 4.** Morfología de macroconidios y microconidios de las tres especies de *Fusarium* patógenas de sandía. A = macroconidios de *F. brachygibbosum*, B = macroconidios de *F. falciforme* y C) macroconidios de *F. oxysporum*. D = microconidios de *F. brachygibbosum*, E = microconidios de *F. falciforme* y F) microconidios de *F. oxysporum*.  
**Figure 4.** Morphology of macroconidia and microconidia of three *Fusarium* species pathogenic to watermelon. A = macroconidia of *F. brachygibbosum*, B = macroconidia of *F. falciforme*, and C) macroconidia of *F. oxysporum*. D = macroconidia of *F. brachygibbosum*, E = microconidia of *F. falciforme*, and F) microconidia of *F. oxysporum*.

Los microconidios de *F. brachygibbosum* fueron ovales y ocasionalmente ovoides, por lo general con un septo, rara vez con dos o ninguno. Los de *F. oxysporum* fueron ovales elípticos y en forma de riñón sin septos. *F. falciforme* presentó microconidios con la parte basal truncada, ovales, elipsoides y reniformes, con algunos piriformes y fusiformes, con ninguno, uno o dos septos (Cuadro 3, Figura 4 D-F). La variabilidad de formas no permitió observar diferencias en los microconidios de las diferentes especies; solo la ausencia de septos en todos los microconidios observados en *F. oxysporum* (Figura 4F) parece ser un rasgo distintivo.

but due to the variability in size within the species, it was not possible to observe the differences between them. Macroconidia with Fb-8 and Fb-9 morphotypes had no significant size differences compared to *F. oxysporum* Fo-38 morphotypes. No significant differences were detected in the size of Fb-41, Fo-39 and Ff-49 macroconidia, nor among Fb-67, Ff-50 and Ff-14 macroconidia.

Table 5 shows the average length and width of the macroconidia, according to the number of septa and the average of 50 cells. In general, significant differences were detected in the size of the macroconidia among isolates but not among

Cuadro 4. Tamaño de macroconidios de aislados de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía, desarrollados en CLA, de acuerdo con su número de septos.Table 4. Size of macroconidia of *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* isolates pathogenic to watermelon grown in CLA, according to the number of septa.

|                          | Tamaño de macroconidios (µm)* |             |                  |             |              |             |              |             |                       |              |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------|--------------|
|                          |                               |             | Número de septos |             |              |             |              |             | Promedio <sup>†</sup> |              |
|                          | 3                             | 4           | 5                | 6           |              |             |              |             |                       |              |
| <i>F. brachygibbosum</i> | Largo                         | Ancho       | Largo            | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo        | Ancho       | Largo                 | Ancho        |
| Fb-8                     | 30.74 ± 4.49                  | 3.29 ± 0.35 | 35.13 ± 3.79     | 3.18 ± 0.35 | -            | -           | -            | -           | 31.45 ± 4.09F         | 3.28 ± 0.35E |
| Fb-9                     | 34.16 ± 3.72                  | 3.58 ± 0.52 | 38.98 ± 2.16     | 4.04 ± 0.30 | 42.34 ± 2.93 | 3.54 ± 0.13 | -            | -           | 35.52 ± 4.35 E        | 3.65 ± 0.51D |
| Fb-41                    | 35.52 ± 4.49                  | 3.70 ± 0.55 | 38.25 ± 5.08     | 3.85 ± 0.64 | 39.46 ± 9.50 | 4.13 ± 0.51 | -            | -           | 37.04 ± 5.33DE        | 3.80 ± 0.59D |
| Fb-67                    | 40.01 ± 7.19                  | 4.28 ± 0.37 | 45.04 ± 5.65     | 4.32 ± 0.47 | 50.08 ± 1.54 | 4.61 ± 0.28 | -            | -           | 43.04 ± 6.97AB        | 4.33 ± 0.42C |
| <i>F. falciforme</i>     |                               |             |                  |             |              |             |              |             |                       |              |
| Ff-14                    | 40.11 ± 0.65                  | 4.69 ± 0.11 | 43.55 ± 1.16     | 5.03 ± 0.10 | 45.90 ± 0.68 | 5.35 ± 0.08 | 47.3 ± 0.23  | 5.64 ± 0.10 | 44.04 ± 0.82A         | 5.13 ± 0.10A |
| Ff-49                    | 37.60 ± 1.59                  | 4.47 ± 0.28 | 39.10 ± 1.46     | 4.82 ± 0.20 | 40.67 ± 1.30 | 4.69 ± 0.42 | 43.30 ± 1.55 | 5.07 ± 0.36 | 39.90 ± 1.45CD        | 4.77 ± 0.29B |
| Ff-50                    | -                             | -           | 38.74 ± 0.57     | 3.80 ± 0.16 | 41.04 ± 0.92 | 3.74 ± 0.10 | 43.45 ± 0.62 | 3.88 ± 0.06 | 40.56 ± 0.71BCD       | 3.83 ± 0.12D |
| <i>F. oxysporum</i>      |                               |             |                  |             |              |             |              |             |                       |              |
| Fo-38                    | 32.22 ± 3.07                  | 3.32 ± 0.47 | 35.48 ± 2.84     | 3.26 ± 0.31 | -            | -           | -            | -           | 33.26 ± 3.00E         | 3.30 ± 0.42E |

\* Media ± SD. Letras diferentes indican diferencia significativa (p&lt;0.05) / Means ± SD. Different letters indicate a significant difference (p&lt; 0.05).

† Promedio de 50 células (Average of 50 cells) / Average of 50 cells.

• No se observaron suficientes células para su medición (No observed sufficient cells to measure) / Not enough cells observed.



En el Cuadro 4 se observan las medias de largo y ancho de los macroconidios de acuerdo con el número de septos y el promedio de 50 células. El análisis estadístico permitió detectar diferencias significativas en el largo y ancho promedio de los macroconidios entre los aislados; sin embargo, la variabilidad de tamaños dentro de las especies no permitió establecer diferencias entre ellas. Los macroconidios de los morfotipos Fb-8 y Fb-9 no mostraron diferencias significativas en tamaño con respecto a los morfotipos Fo-38 de *F. oxysporum*. No se detectó diferencia significativa entre el tamaño de los macroconidios de Fb-41, Fo-39 y Ff-49. Tampoco se observó diferencia significativa entre Fb-67, Ff-50 y Ff-14.

El Cuadro 5 presentan las medias de largo y ancho de los microconidios de acuerdo con el número de septos y el promedio de 50 células. Se detectaron diferencias significativas en el tamaño de los microconidios entre los aislados en general, pero no entre especies. Los morfotipos Fb-41, Fb-67 y Fb-9 presentaron los microconidios de mayor longitud, mientras que Fb-8 fue el de menor tamaño.

## DISCUSIÓN

Padwick (1945) describió que *F. brachygibbosum* crece en PDA desarrollando abundante micelio aéreo, blanco, con tonos rosados y medio de color rojo-sangre. Con microconidios típicos de forma ovoide a fusiforme, o ligeramente curvados cuando son septados, con ninguno, uno, dos o tres septos. Macroconidios dispersos finamente en la superficie del agar, hiperbólicamente curvados, células centrales anchas y de 0 a 5 septos. Células del ápice afiladas y células basales ligeramente afiladas con forma de pie típica. Clamidosporas terminales e intercalares, simples y en cadenas; generalmente unicelulares y globosas, ocasionalmente de 2

species. The Fb-41, Fb-67 and Fb-9 morphotypes had the longest microconidia, while Fb-8 had the shortest.

## DISCUSSION

Padwick (1945) stated that *F. brachygibbosum* grows in PDA and develops an abundance of aerial white mycelia, pinkish tone, and blood-red color in the agar; its microconidia are typically ovoid to fusiform, or slightly curved when they have septa, with one, two, three or no septa. Hyperbolically curved macroconidia are finely dispersed over the agar surface; they have wide central cells and 0-5 septa. Sharp apical cells and slightly sharp basal cells have a typical foot-like shape; terminal and intercalary chlamydospores, single or in chains, are usually unicellular and globose, occasionally with two smooth and granular cells. This description is in agreement with the four *F. brachygibbosum* morphotypes that were found in this study, but the color of the colony and the medium coincides only with the color of Fb-67 and not with the color of Fb-8, Fb-9 and Fb-41.

In general, the type of mycelium, the color of the colonies and the culture medium, as well as the morphology of the macro- and microconidia observed in the most recent *F. brachygibbosum* studies (Al-Sadi *et al.*, 2012; Mirhosseini *et al.*, 2014; Renteria-Martinez *et al.*, 2015; Stack *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018) correspond to the morphotype described by Padwick (1945). All these studies found white colonies that turned yellow with pink or orange tones, and stained the PDA medium bright red. When they were grown in CLA, the macroconidia had thick walls, a bulky center and slightly curved ends (attenuated hook), and a typical foot-like or slightly foot-shaped basal cell; most of them had 4-5 septa.



Cuadro 5. Tamaño de microconidios de los morfotipos de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patogénicos en sandía, desarrollados en CLA, de acuerdo con su número de septos.Table 5. Size of microconidia of *F. brachygibbosum* isolates pathogenic to watermelon and pathogenic isolates that were representative of *F. solani* and *F. oxysporum* grown in CLA, according to the number of septa.

|                          | Tamaño de microconidios ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup> |                 |                  |                 |                  |                 | Promedio <sup>b</sup> |                   |
|--------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
|                          | 0                                                      |                 | 1                |                 | 2                |                 | Largo                 | Ancho             |
| <i>F. brachygibbosum</i> | Largo                                                  | Ancho           | Largo            | Ancho           | Largo            | Ancho           | Largo                 | Ancho             |
| Fb-8                     | -                                                      | -               | 13.79 $\pm$ 1.84 | 3.95 $\pm$ 0.46 | -                | -               | 13.79 $\pm$ 1.84b     | 3.95 $\pm$ 0.46C  |
| Fb-9                     | -                                                      | -               | 7.15 $\pm$ 0.43  | 2.40 $\pm$ 0.64 | -                | -               | 7.15 $\pm$ 0.43b      | 2.40 $\pm$ 0.64A  |
| Fb-41                    | -                                                      | -               | 18.78 $\pm$ 2.92 | 3.81 $\pm$ 0.47 | -                | -               | 18.78 $\pm$ 2.92a     | 3.81 $\pm$ 0.47A  |
| Fb-67                    | -                                                      | -               | 17.73 $\pm$ 3.67 | 3.91 $\pm$ 2.53 | -                | -               | 17.73 $\pm$ 3.67a     | 3.91 $\pm$ 2.53A  |
| <i>F. falciforme</i>     |                                                        |                 |                  |                 |                  |                 |                       |                   |
| Ff-14                    | 11.42 $\pm$ 2.29                                       | 3.21 $\pm$ 0.34 | 11.06 $\pm$ 2.39 | 3.15 $\pm$ 0.35 | -                | -               | 11.18 $\pm$ 2.36c     | 3.17 $\pm$ 0.35A  |
| Ff-49                    | 9.41 $\pm$ 0.86                                        | 2.94 $\pm$ 0.63 | 10.61 $\pm$ 0.88 | 3.85 $\pm$ 0.51 | 11.18 $\pm$ 1.02 | 4.91 $\pm$ 0.47 | 10.29 $\pm$ 0.89cd    | 3.73 $\pm$ 0.55AB |
| Ff-50                    | 10.26 $\pm$ 1.10                                       | 3.68 $\pm$ 0.53 | 11.99 $\pm$ 0.45 | 4.18 $\pm$ 0.25 | -                | -               | 11.17 $\pm$ 0.75c     | 3.95 $\pm$ 0.38A  |
| <i>F. oxysporum</i>      |                                                        |                 |                  |                 |                  |                 |                       |                   |
| Fo-38                    | 8.56 $\pm$ 1.40                                        | 3.05 $\pm$ 0.56 | -                | -               | -                | -               | 8.56 $\pm$ 1.40de     | 3.05 $\pm$ 0.56BC |

<sup>a</sup> Media  $\pm$  SD. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) / Means  $\pm$  SD. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Promedio de 50 células (Average of 50 cells) / Average of 50 cells.

-No se observaron suficientes células para su medición (No observed sufficient cells to measure) / Not enough cells observed.

células, lisas, granulares. Esta descripción concuerda con los cuatro morfotipos de *F. brachygibbosum* encontrados en el presente trabajo; sin embargo, el color de las colonias y del medio solo concuerda con lo observado en Fb-67 y no con Fb-8, Fb-9 y Fb-41.

En general el tipo de micelio, el color de las colonias, color del medio de cultivo y la morfología de los macroconidios y microconidios, observados en los trabajos más recientes sobre *F. brachygibbosum* (Al-Sadi *et al.*, 2012; Mirhosseini *et al.*, 2014; Renteria-Martinez *et al.*, 2015; Stack *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018), corresponden al morfotipo descrito por Padwick (1945). En todos estos estudios se registraron colonias blancas que se toman amarillo claro con tonos rosa o naranja y el medio PDA teñido en rojo brillante. El crecimiento en CLA permitió observar macroconidios de paredes gruesas, un centro abultado con extremos ligeramente curvados (gancho atenuado) y una célula basal típica en forma de pie o ligeramente en forma de pie, en su mayoría con 4 a 5 septos.

El morfotipo de *F. oxysporum* desarrolló un micelio aéreo blanco que se tornó púrpura después de una semana en PDA, similar a lo descrito por Kleczewski y Egel (2011) acerca de *F. oxysporum* f.sp. *niveum* raza 1, aunque sin formación de esporodocios. Al cultivarse en CLA, las características de clamidosporas, células conidiógenas, macroconidios y microconidios correspondieron a lo señalado por Leslie y Summerell (2006), para la especie.

El tipo de crecimiento de las colonias en PDA permite distinguir entre los morfotipos de *F. brachygibbosum* (aéreo) y los de *F. falciforme* (postrado). La presencia de monofialides largas y delgadas, mostradas en los morfotipos *F. falciforme* (Summerbell y Schroers., 2002), es una característica que permite diferenciarlos de *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum*, los cuales desarrollaron monofialides más cortas. La forma de los macroconidios de

The *F. oxysporum* morphotype developed white aerial mycelium that turned purple after a week in PDA, a result similar to that described by Kleczewski and Egel (2011) regarding *F. oxysporum* f.sp. *niveum* race 1, but with no sporodochia formation. When cultured in CLA, the characteristics of the chlamydo-spores, conidiogenic cells, macroconidia and microconidia were in agreement with the results obtained by Leslie and Summerell (2006) for the species.

The type of growth colonies in PDA makes it possible to distinguish between *F. brachygibbosum* (aerial) and *F. falciforme* (prostrate) morphotypes. The presence of long and thin monophialides observed in *F. falciforme* morphotypes (Summerbell and Schroers, 2002) is a characteristic that allows differentiating them from *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*, which develop shorter monophialides. The shape of *F. falciforme* macroconidia is another trait that distinguishes it from the other species. Similar to the results obtained by Chelri *et al.* (2015), macroconidia of this species were polyseptate, wide and straight or slightly curved, with round apical cells and basal cells with slightly trimmed ends.

The color developed in the agar, the type of conidiogenic cells, as well as macroconidial morphology and size, can cause *F. brachygibbosum* to be mistakenly identified as *F. oxysporum*, which is more common in most of the crops in Sonora, but the morphology of the chlamydo-spores, specifically the thickness of their walls, may be a distinctive characteristic that allows differentiating the two species. The morphology of *F. brachygibbosum* chlamydo-spores is in agreement with the results obtained by Cao *et al.* (2018). Another characteristic that differs among these species is the lack of septa in *F. oxysporum* microconidia, while *F. brachygibbosum* had mostly microconidia with one septum.

*F. falciforme* es otro rasgo que lo distingue de las otras especies. Similar a lo reportado por Chelri *et al.* (2015) los macroconidios de esta especie fueron poliseptados, anchos y rectos o ligeramente curvados, con células apicales redondeadas y células basales con extremos apenas recortados.

La coloración desarrollada en el agar, el tipo de células conidiógenas, además de la morfología y tamaño de los macroconidios pueden hacer que *F. brachygibbosum* sea identificado erróneamente como *F. oxysporum*, que es más común en la mayoría de los cultivos de la región; pero la morfología de las clamidosporas, específicamente el grosor de la pared, puede ser una característica distintiva que permita diferenciar entre las dos especies. La morfología de las clamidosporas de *F. brachygibbosum* correspondió con lo observado por Cao *et al.* (2018). Otra característica diferente entre estas especies fue la ausencia de septos en los microconidios de *F. oxysporum*, mientras que en *F. brachygibbosum* predominaron los de un septo.

La variabilidad en el tamaño de macroconidios y microconidios entre los morfotipos de una misma especie, no permitió diferenciar entre las tres especies de *Fusarium*.

Se han reportado diferentes tamaños en los conidios de *F. brachygibbosum* (Xia *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2017; Mirhosseini *et al.*, 2014; Al-Mahmooli *et al.*, 2013;), en la mayoría de los casos de menor tamaño a los observados en el presente trabajo. El tamaño de los macroconidios de *F. falciforme* fue similar a lo reportado por Chelri *et al.* (2015). Por su parte, la morfología y tamaño de los macroconidios de *F. oxysporum* concordaron con lo señalado por Chelri *et al.* (2011).

## CONCLUSIONES

Algunas características, tales como: el grosor de paredes en las clamidosporas, la morfología de los

The variability in macroconidia and microconidia size among morphotypes of the same species did not allow differentiating among the *Fusarium* species.

*F. brachygibbosum* conidia of different sizes have been reported (Xia *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2017; Mirhosseini *et al.*, 2014; Al-Mahmooli *et al.*, 2013) and, in most cases, they have been shorter than the ones observed in this study. The size of *F. falciforme* macroconidia was similar to the size reported by Chelri *et al.* (2015). Also, the morphology and size of *F. oxysporum* macroconidia were in agreement with the results obtained by Chelri *et al.* (2011).

## CONCLUSIONS

Some characteristics, such as the thickness of chlamyospore walls, macroconidia morphology, type of conidiogenic cells and the presence or absence of septa in microconidia can be distinctive and useful for identifying *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* that are pathogenic to watermelon plants grown in Sonora, Mexico. However, the identified morphologies need to be corroborated through molecular analysis.

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

macroconidios, el tipo de células conidiógenas y la presencia o ausencia de septos en microconidios pueden ser distintivas y de utilidad en la identificación de *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum*, patógenas en plantas de sandía en cultivos localizados en Sonora, México. No obstante, es necesario que la identificación morfológica sea corroborada con un análisis molecular.



LITERATURA CITADA

- Al-Malmoohi IH, Al-Balri YS, Al-Sadi AM and Deadman ML. 2013. First report of *Euphorbia larica* dieback caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Disease* 97(5): 687. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0828-PDN>
- Al-Sadi AM, Al-Jabri AH, Al-Mazroui SS and Al-Malmoohi IH. 2012. Characterization and pathogenicity of fungi and oomycetes associated with root diseases of date palms in Oman. *Crop Protection* 37(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.011>
- Boughalleb N, Arnenegol J and Mahjoub ME. 2005. Detection of races 1 and 2 of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and their distribution in watermelon fields in Tunisia. *Journal of Phytopathology* 153:162-168. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00947.x>
- Cao S, Yang N, Zhao C, Liu J, Han C and Wu X. 2018. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. *Journal of General Plant Pathology* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0792-5>
- Chehri K, Salleh B, Yü-Martula T, Reddy KRN, Abbasi S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18(4):341-351. [doi:10.1016/j.sjbs.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.007)
- Chehri K, Salleh B and Zakaria L. 2015. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial ecology* 69(3): 457-471. DOI 10.1007/s00248-014-0494-2
- Egel DS and Martyn RD. 2007. *Fusarium* wilt of watermelon and other cucurbits. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0122-01
- Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA and Nelson PE. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72:151-153. DOI: 10.1094/Phyto-72-151
- Gashgari R, Gherbawy Y, Ameen F and Alsharari S. 2016. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9(1): e26157. DOI: 10.5812/jjm.26157
- Ismail MA, Abdel-Hafez SI, Hussein N A and Abdel-Hameed NA. 2015. Contributions to the genus *Fusarium* in Egypt with dichotomous keys for identification of species. 1<sup>st</sup> ed. Tmkarpiński Publisher Suchy Las, Poland. 179 pp. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/profile/Mady\\_Ismail/publication/321344925\\_FUSARIUM\\_IN\\_EGYPT\\_WITH\\_DICHOTOMOUS\\_KEYS\\_FOR\\_IDENTIFICATION\\_OF\\_SPECIES\\_Contributions\\_to\\_the\\_genus\\_Fusarium\\_in\\_Egypt\\_with\\_dichotomous\\_keys\\_for\\_identification\\_of\\_species/links/5a1de0980f7e9b9d5effb25e\\_FUSARIUM-IN-EGYPT-WITH-DICHOTOMOUS-KEYS-FOR-IDENTIFICATION-OF-SPECIES-Contributions-to-the-genus-Fusarium-in-Egypt-with-dichotomous-keys-for-identification-of-species.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mady_Ismail/publication/321344925_FUSARIUM_IN_EGYPT_WITH_DICHOTOMOUS_KEYS_FOR_IDENTIFICATION_OF_SPECIES_Contributions_to_the_genus_Fusarium_in_Egypt_with_dichotomous_keys_for_identification_of_species/links/5a1de0980f7e9b9d5effb25e_FUSARIUM-IN-EGYPT-WITH-DICHOTOMOUS-KEYS-FOR-IDENTIFICATION-OF-SPECIES-Contributions-to-the-genus-Fusarium-in-Egypt-with-dichotomous-keys-for-identification-of-species.pdf)
- Kleczewski NM and Egel DS. 2011. A diagnostic guide for *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Health Progress*. [doi:10.1094/PHP-2011-1129-01-DG](https://doi.org/10.1094/PHP-2011-1129-01-DG)
- Klotz LV, Nelson PE and Toussoun TA. 1988. A medium for enhancement of chlamydo-spores formation in *Fusarium* species. *Mycologia* 80:108-109. DOI: 10.2307/3807500
- Leslie JF, Zeller KA and Summerell BA. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59(3):107-117. [doi:10.1006/pmpp.2001.0351](https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0351)
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London, Victoria, Australia. 388 pp.
- Mehl HL and Epstein L. 2007. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and race 2 with PCR and production of disease-free pumpkin seeds. *Plant Disease* 91(10):1288-1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1288>
- Mirhosseini HA, Babaeizad V and Hashemi L. 2014. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. *Journal of Plant Pathology* 96(2): 431-439. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I2.002>
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.
- Padwick GW. 1945. Notes on Indian fungi III. *Mycological Papers*. 12:1-15.
- Renteria-Martinez ME, Meza-Moller A, Guerra-Camacho MA, Romo-Tamayo F, Ochoa-Meza A and Moreno-Salazar SF. 2015. First report of watermelon wilting caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 99(5):729. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1073-PDN>
- Renteria-Martinez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE, and Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(2):233-255. DOI: <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-1>
- Rna AG, Babikar A, Dngash Y, Ellussein AA, Elhalim TSA and Babikar AGT. 2014. *Fusarium brachygibbosum* a plausible candidate for deployment as a bioagent for *Striga hermonthica* management in Sorghum. Third Conference of Pests Management in Sudan February 3-4, 2014 CPRC-ARC, Wad Medani (Sudan). <http://www.arc-cprc.sd/weedscience.pdf>
- Shan LY, Cui WY, Zhang DD, Zhang J, Ma NN, Bao YM, Dai XF and Guo W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101(5): 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Smith, SN. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin* 16:97-120. <http://140.112.183.156/pdf/16-3/p097-120.pdf>
- Stack AJ, Yaghmour MA, Kirkpatrick SC, Gordon TR and Bostock RM. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated almond trees in California. *Plant Disease* 101(2): 390-390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0929-PDN>



- Summerbell RC and Schroers HJ. 2002. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falcatiforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(8): 2866-2875. doi:10.1128/JCM.40.8.2866-2875.2002
- Tan DC, Flematti GR, Glisalberti EL, Sivasithamparan K, Chakraborty S, Obanor F and Barbetti MJ. 2011. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and 'sheep feed refusal disorders' in Western Australia. *Mycotoxin research* 27(2):123-135. doi: 10.1007/s12550-010-0085-0
- Trabelsi R, Sellani H, Gharbi Y, Krid S, Cheffi M, Kamnoun S, Danmak M, Mseddi A, Gdoura R and Ali TM. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *Biotech* 7:28. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0587-3>
- Turóczy GV, Posta K, Badenszky L and Bán R. 2011. *Fusarium* wilt of water melon caused by *Fusarium solani* in Hungary. *Plant Breeding and Seeds Science* 63:23-28. DOI: 10.2478/v10129-011-0012-3
- Xia B, Hu J, Zhu X, Liang Y, Ren X, Wu Y and Chen D. 2018. First report of sunflower broomrape wilt caused by *Fusarium brachygybbosum* in China. *Plant Disease* (Accepted) <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1939-PDN>
- Zhang M, Xu JH, Liu G, Yao XF, Li PF and Yang XP. 2014. Characterization of the watermelon seedling infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Pathology*. 64:1076-1084. <https://doi.org/10.1111/ppa.12355>
- Zhou XG, Everts KL and Bruton BD. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. *Plant Disease* 94(1):92-98. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0092>



**Molecular markers for multiplex detection and quantification of pathogenic Fusarium in watermelon**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | Plant Disease   |
| Manuscript ID:                | PDIS-01-19-0176-RE  |
| Manuscript Type:              | Research  |
| Date Submitted by the Author: | 31-Jan-2019   |
| Complete List of Authors:     | Ranteria- Martinez, María; Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería<br>Fernández-Herrera, Ernesto; Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería<br>Moreno-Salazar, Sergio; Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería<br>Guzmán-Ortiz, Juan ; Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas<br>Rodríguez-Beas, César; Universidad de Sonora, Departamento de Física |
| Keywords:                     | Fungi < Causal Agent, Fruit < Crop Type, Pathogen detection < Subject Areas   |
|                               |   |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Molecular markers for multiplex detection and quantification of  
pathogenic *Fusarium* in watermelon**

M. E. Rentería-Martínez, E. Fernández-Herrera, S. F. Moreno-Salazar\*, Departamento de  
Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Sonora, México; J. M. Guzmán-Ortiz,  
Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Sonora,  
México; C. Rodríguez-Beas, Departamento de Física, Universidad de Sonora, Sonora, México.

\*Corresponding Author: S. F. Moreno-Salazar

E-mail: sergio.moreno@unison.mx

**ABSTRACT**

Rentería-Martínez, M. E., Fernández-Herrera, E., Moreno-Salazar, S. F., Guzmán-Ortiz, J. M.,  
Rodríguez-Beas, C. 2019. Molecular markers for multiplex detection and quantification of  
pathogenic *Fusarium* in watermelon. Plant Dis.

*Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum* have been identified as some  
of the main fungi causing root rotting, wilting, and death of watermelon plants cultivated in the  
state of Sonora, México. In this investigation, we designed six pairs of primers that amplified  
simultaneously bands of 621 and 360, 180 and 593, and 267 and 447 bp, corresponding to  
fragments of genes *TEF-1α/RPB2* of *F. falciforme*, *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum*,  
respectively. These fragments are molecular markers that allow detecting the presence of any of  
the three fungal species in the same PCR reaction. In addition, three pairs of primers were  
designed for these regions that amplified bands of 129, 157, and 153 bp, whose size is adequate  
to quantify the fungal load of each species by means of SYBR Green-qPCR. Results of both  
assays can be obtained in less than 3 hours. Molecular identification of fungi is complementary  
and occasionally can replace the methods based on culture and morphological identification. A

1  
2  
3 pathogenicity tests, which delays decision taking (Everts and Himmelstein, 2015). On the other  
4  
5 side, the morphological characteristics of the fungi, although they are easily detectable and  
6  
7 comparable, do not allow differentiating among close species or lower rank classifications,  
8  
9 underestimating the true fungal diversity (Taylor and Fisher, 2003).  
10

11  
12 Current advances in molecular methods have allowed for a fast and accurate detection of  
13  
14 diverse plant pathogens. For filamentous fungi, an exact identification can be achieved by means  
15  
16 of multilocus analysis of the sequences of fragments of genes: *RPB1*, *RPB2*, *nucLSU*, *nucSSU*,  
17  
18 *mtSSU*, *TEF1a*, and *mtATP6* (Choi et al. 2013; Stielow et al. 2015). However, multilocus  
19  
20 analyses are laborious, delayed, and costly because they require sequencing of fragments. The  
21  
22 design of specific primers within the sequences of those fragments allow detecting short  
23  
24 sequences that function as molecular markers of each species; amplification through PCR of  
25  
26 these sequences can reduce drastically the detection times (Gao et al. 2004). It is important that  
27  
28 the pairs of primers be evaluated *in silico* individually or combined, if other primers are going to  
29  
30 be used in the same reaction. Formation of hairpins, self-dimers, and hetero-dimers must be  
31  
32 avoided, and similar fusion temperatures must be aimed at so they can be used successfully for  
33  
34 the simultaneous identification of pathogenic species.  
35  
36  
37  
38  
39

40 Primers that produce shorter fragments can be designed to be used in real time  
41  
42 quantitative PCR reactions (qPCR) to determine the fungal load at the moment. A fast  
43  
44 quantification is important to select the type and amount of fungicide to be applied to accomplish  
45  
46 an integrated management or to take decisions regarding the best time to plant and the biological  
47  
48 control methods (Naroei and Salari, 2015). The multiplex polymerase chain reactions (either  
49  
50 PCR or qPCR) allows amplifying one or more target sequences simultaneously by including  
51  
52 more than one pair of primers in the same reaction tube. This technique reduces costs, time, and  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

---



1  
2  
3 laboratory efforts. Multiplex PCR is a valuable tool to identify viruses, bacteria, fungi, and  
4  
5 parasites, allowing for the individual or simultaneous detection of diverse agents that can cause  
6  
7 similar syndromes and/or similar epidemiological characteristics (Elnifro et al. 2000;  
8  
9 Markoulatos et al. 2002).

10  
11  
12 Based on the aforementioned, in the present work, specific primers were designed and the  
13  
14 multiplex PCR and SYBR Green-qPCR protocols were developed for the simultaneous detection  
15  
16 and quantification of three species causing root rotting in watermelon: *Fusarium falciforme*, *F.*  
17  
18 *brachygibbosum*, and *F. oxysporum*.

## 21 22 **Material and Methods**

23  
24 **Amplification and sequencing of RPB2 and TEF fragments.** DNA was obtained from  
25  
26 monospore cultures of *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, which  
27  
28 cause vascular damage and/or rotting of the crown and root of watermelon plants. Through PCR,  
29  
30 from the DNA of each isolate, a fragment of the gene that codes for the second largest subunit of  
31  
32 the RNA polymerase II (*RPB2*) was obtained as well as another corresponding to the region that  
33  
34 codes for the translation elongation factor 1 $\alpha$  (*TEF-1 $\alpha$* ), which participates in transcription.  
35  
36 DNA extraction, reaction conditions, purification, sequencing, nucleotides correction, and  
37  
38 alignment of amplicons were performed according to Renteria-Martinez et al. (2018).

39  
40  
41 **Design of specific primers for multiplex PCR and qPCR.** From the aligned sequences of the  
42  
43 amplified TEF and RPB2 fragments, several pairs of primers were designed for each species, for  
44  
45 both PCR and qPCR. Established characteristics were:  $T_m = 60^\circ\text{C}$ , size from 18 to 23  
46  
47 nucleotides, % of GC = 50 %. The design of primers for qPCR was restricted to obtain  
48  
49 amplicons smaller than 170 bp. The used software was OligoAnalyzer 3.1  
50  
51 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*In silico* specificity of the designed oligonucleotides was determined using multiplex alignments with the software ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), verifying their location in divergent sites among the three *Fusarium* species. The analysis was complemented with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to verify the alignment of the oligonucleotides with other sequences of the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>), corresponding to the DNA fragment and the species from which they were designed. In addition, all designed oligonucleotides were analyzed to detect possible formation of hairpins, self-dimers, and hetero-dimers at a value of  $\Delta G = -6.6$  Kcal/mol.

Each pair of specific primer was tested to amplify only the DNA extracted from the target *Fusarium*. DNA from non-target *Fusarium* species, *Rhizoctonia solani*, *Ceratobasidium* sp., and *Trichoderma harzianum* was used as negative controls of each specific primer. Molecular biology-grade water was used as negative control of the reaction. Reaction mixtures were prepared with: 2 ml of 5x Green Go Taq Flexi Buffer, 1.2 ml of  $MgCl_2$  (25 mM), 0.2 ml of dNTP's (10 mM each), 0.05 ml of Go Taq DNA polymerase (5 U/ml) (Promega), 0.5 ml of each primer (10 mM), 1 ml of DNA (20 ng/ml), and DEPC- $H_2O$  up to 10 ml. All PCR products were subjected to 1.8 % agarose gel electrophoresis. The pair of primers that gave the highest intensity in the band expected for each species, in each locus, and that did not amplify in any of the negative controls was selected. Reaction conditions of each pair of primers are given in Table 1.

#### Development of multiplex PCR

**Duplex PCR assays.** To increase certainty in the detection of each *Fusarium* species, three separate PCR reactions were performed. Each reaction was performed in a 200  $\mu$ l tube, placing a mixture of genomic DNA of *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, *F. oxysporum*. In one of

1  
2  
3  
4 the reactions, two pairs of primers were added, one of the *TEF-1α* locus and another of the  
5  
6 *RPB2*, specific for *F. falciforme*. In the other two reactions, two pairs of specific  
7  
8 oligonucleotides for *F. brachygibbosum* and *F. oxysporum*, respectively, were added.  
9

10  
11 **Triplex PCR assays.** Aimed at detecting the presence of one, two, or the three *Fusarium* species  
12  
13 in one single assay, PCR reactions were performed using three pairs of primers in the same  
14  
15 reaction tube. A pair of specific primers was used for each of the three *Fusarium* species and a  
16  
17 mixture of the total DNA of the three species.  
18

19  
20 The reaction mixtures of the duplex and triplex PCR amplifications were escalated to a  
21  
22 reaction volume of 20 and 30  $\mu$ l, respectively. The final concentrations of primers,  $MgCl_2$ ,  
23  
24 dNTPs, and Taq polymerase, as well as the alignment temperatures, were optimized by means of  
25  
26 gradients (Henegariu et al. 1997; Sint et al. 2012). The amplification process included an initial  
27  
28 denaturation of 2 min at 95°C, followed by 26 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, alignment  
29  
30 during 45 s, and extension at 72°C for 45 s. Final extension was at 72°C for 10 min. Products  
31  
32 generated in each reaction were visualized through 1.8% agarose gel electrophoresis.  
33  
34

#### 35 36 **Standardization of real time PCR with SYBR Green**

37  
38 SYBR Green-qPCR assays were performed in a 48-well StepOne equipment (Applied  
39  
40 Biosystems, USA). The optimal concentration of the primers designed for each species was  
41  
42 determined in the range of 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1000 nM, in a 4x4 matrix, choosing  
43  
44 the one with the highest fluorescence and the least value of threshold cycle (Ct). The reaction  
45  
46 mixture included 10  $\mu$ l of SYBR Green JumpStart® Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis,  
47  
48 MO), 2  $\mu$ l of each primer, 2  $\mu$ l of cDNA diluted at 1:10, and 4  $\mu$ l of molecular biology-grade  
49  
50 water. Once the optimal concentration of primers had been determined, assays with the cDNA of  
51  
52 each *Fusarium* species were performed. To confirm the lack of dimers among primers,  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



DEPC-water was used as negative control. The amplification program used was: one initial denaturation cycle at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles at 94°C for 15 s and 60°C for 60 s. All reactions were performed in triplicate to warrant the reproducibility of results, and at least two replicates were performed of each experiment. DEPC-water was used as negative control of the reaction. Specificity of real time PCR was verified through dissociation curves. Detection thresholds of reactions were determined from standard curves elaborated using cDNA of TEF region of each *Fusarium* specie. Regression lines were generated for each standard curve.

## Results

**Design and specificity of the specific primers for multiplex PCR and qPCR.** Six pairs of primers were designed to perform the PCR reactions in multiplex assays as well as three pairs for the qPCR reactions. All primers were designed in divergent sites of fragments TEF and RPB2 (Fig. 1), obtaining the oligonucleotide pairs named as: Ff\_EF-f/Ff\_EF-r and Ff\_RPB2-f/Ff\_RPB2-r specific for *Fusarium falciforme*, Fb\_EF-f/Fb\_EF-r and Fb\_RPB2-f/Fb\_RPB2-f specific for *F. brachygibbosum*, and Fo\_EF-f/Fo\_EF-r and Fo\_RPB2-f/Fo\_RPB2-f for *F. oxysporum*. The pairs of primers for qPCR were designed from the fragment TEF, resulting in primers: Ff\_qEF-f/Ff\_qEF-r, Fb\_qEF-f/Fb\_qEF-r, and Fo\_qEF-f/Fo\_qEF-r, corresponding to *F. falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, respectively. Table 1 depicts the oligonucleotide sequences of each of the obtained primers.

All primers aligned with 100% similitude with the sequences of other isolates of the same species from the GenBank of NCBI.

Figure 2 shows the specificity of each set of primers. Each pair amplified only one band, with the expected size (as indicated in Table 1) and in DNA of the species for which it was designed. None of the primers amplified the DNA of the species used as negative controls.



### Multiplex PCR

**Duplex PCR assays.** The designed primers amplified simultaneously a pair of bands of 621 and 360, 267 and 447, 180 and 593 bp, corresponding to the fragments of genes *TEF-1 $\alpha$ /RPB2* from 25 *F. falciforme* isolates, four *F. brachygibbosum*, and two *F. oxysporum*, respectively. Figure 3A, 3B y 3C shows the size of the amplicons of a representative isolate of each fungus for each duplex PCR run, and the lack of bands in the negative controls (non-target DNA and water).

**Triplic PCR assays.** Simultaneous DNA amplification and detection of the three *Fusarium* species were achieved only with the combination of the specific primers designed from the *TEF-1  $\alpha$*  locus. Figure 4 shows 621, 267, and 180 bp PCR products corresponding to DNA amplified from of *F. falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, respectively. All assays were performed in triplicate, using the same negative controls as those used for the duplex assays. Sensitivity of the assays was assessed making serial DNA dilutions from a concentration of 10 ng/ $\mu$ l and some primers did no longer amplify when the corresponding DNA concentration was of 1 pg/ $\mu$ l (data not shown).

### Standardization and validation of real time PCR with SYBR Green

Figure 2 shows the amplicons obtained by means of PCR using the pairs of primers designed for qPCR. The 129, 155, and 153 bp bands correspond to fragments of the gene *TEF-1 $\alpha$*  of *F. falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, respectively, confirming the specificity of the designed oligonucleotides.

Figures 5, 6, and 7 reveal the feasibility of detecting and quantifying the fungal load of the three *Fusarium* species by means of SYBR Green-qPCR. Figures 5A, 6A, and 7A show the amplification curves in real time of the serial dilutions and of the negative control of *F. falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, respectively. In the same order, Figures 5B,

1  
2  
3 6B, and 7B present the SYBR Green-qPCR dissociation curves (with their respective  
4 temperature peak) and 5C, 6C, and 7C depict the standard DNA amplification curves of the three  
5  
6 species.  
7  
8

### 9 **Discussion**

10  
11 We describe two research protocols designed for the simultaneous detection through end point  
12 PCR and for the diagnosis of the presence/absence or quantification through SYBR Green-qPCR  
13 of *Fusarium oxysporum*, *F. falciforme*, and *F. brachygibbosum*. These are three filamentous  
14  
15 fungi species that are part of the fungal complex that, days before harvesting, cause vine  
16  
17 collapse, wilting and rotting of the crown, stem, and secondary roots of watermelon plants  
18  
19 cultivated in the Northwest of México (Renteria-Martinez et al. 2018).  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 The diseases that cause the vine decline in cucurbits, like melon (*Cucumis melo*) and  
27  
28 watermelon (*Citrullus lanatus*) are caused by microorganisms of the soil and constitute the main  
29  
30 limitation in cucurbits-producing regions worldwide. The causal agents can vary:  
31  
32 *Monosporascus cannonballus* (Beltrán et al. 2008), *Rhizopycnis vagum* (Westphal et al. 2011),  
33  
34 *Olpidium bornovanus* (Stanghellini et al. 2014), *Rhizoctonia solani*, *Ceratobasidium* sp., and  
35  
36 some *Fusarium* species (Renteria-Martinez et al. 2018), but the observed symptoms are very  
37  
38 similar: sunken lesions, necrosis, rotting of secondary and tertiary roots, which disable the plant  
39  
40 to get sufficient water and minerals to sustain the aerial parts, and induce wilting and death of the  
41  
42 plants before the harvest, when temperatures and water stress favor the development of fungi.  
43  
44 This symptomatology causes diminished yields due to the production of fruits without  
45  
46 commercial value. The fact that some fungal species, together or separately, can cause similar  
47  
48 damage in the roots of watermelon plants, makes it necessary to count upon fast and accurate  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 6B, and 7B present the SYBR Green-qPCR dissociation curves (with their respective  
4 temperature peak) and 5C, 6C, and 7C depict the standard DNA amplification curves of the three  
5 species.  
6  
7  
8  
9

### 10 **Discussion**

11  
12 We describe two research protocols designed for the simultaneous detection through end point  
13 PCR and for the diagnosis of the presence/absence or quantification through SYBR Green-qPCR  
14 of *Fusarium oxysporum*, *F. falciforme*, and *F. brachygibbosum*. These are three filamentous  
15 fungi species that are part of the fungal complex that, days before harvesting, cause vine  
16 collapse, wilting and rotting of the crown, stem, and secondary roots of watermelon plants  
17 cultivated in the Northwest of México (Renteria-Martinez et al. 2018).  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25  
26 The diseases that cause the vine decline in cucurbits, like melon (*Cucumis melo*) and  
27 watermelon (*Citrullus lanatus*) are caused by microorganisms of the soil and constitute the main  
28 limitation in cucurbits-producing regions worldwide. The causal agents can vary:  
29 *Monosporascus cannonballus* (Beltrán et al. 2008), *Rhizopycnis vagum* (Westphal et al. 2011),  
30 *Olpidium bornovanus* (Stanghellini et al. 2014), *Rhizoctonia solani*, *Ceratobasidium* sp., and  
31 some *Fusarium* species (Renteria-Martinez et al. 2018), but the observed symptoms are very  
32 similar: sunken lesions, necrosis, rotting of secondary and tertiary roots, which disable the plant  
33 to get sufficient water and minerals to sustain the aerial parts, and induce wilting and death of the  
34 plants before the harvest, when temperatures and water stress favor the development of fungi.  
35 This symptomatology causes diminished yields due to the production of fruits without  
36 commercial value. The fact that some fungal species, together or separately, can cause similar  
37 damage in the roots of watermelon plants, makes it necessary to count upon fast and accurate  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 diagnosis tools, like PCR. The multiplex PCR and the real time PCR have been used to detect  
4  
5 and quantify, respectively, diverse *Fusarium* species (Yli-Mattila et al. 2017).  
6

7  
8 The design of primer sets that allow amplifying two or more unique DNA fragments in  
9  
10 the genome of a species generates amplicons that function as molecular markers that is useful for  
11  
12 the identification of that species so accuracy and speed of the diagnosis can be increased. On the  
13  
14 other side, the design of oligonucleotides that generate amplified fragments of different sizes in  
15  
16 several species associated with a disease allows detecting them simultaneously. This would  
17  
18 allow analyzing a large number of samples, reducing the time required for the diagnosis of the  
19  
20 disease-causing agent to a maximal time of 3 h. The specific designed primers could be used to  
21  
22 detect pathogenic agents in germination trays, water, seeds, soil, and/or vegetal tissue, even in  
23  
24 the absence of visible disease symptoms. Petkar and Ji (2017), through plate-counting of  
25  
26 seedlings, demonstrated that the pistil, pericarp, or peduncle of the watermelon can be reservoirs  
27  
28 of *Fusarium* with the subsequent infection of the seed, without observing any symptom.  
29  
30

31  
32  
33 Real time PCR provides more accurate information than the endpoint PCR and needs less  
34  
35 time, as it dispenses with the processing after amplification. The technology developed with the  
36  
37 fluorophores that are intercalated in the DNA, as SYBR Green, offers the advantage of  
38  
39 processing a large number of samples in a maximum of 3 h; the optimal design of primers must  
40  
41 be rigorous to avoid the amplification of non-specific products.  
42  
43

44  
45 Zhang et al. (2005) developed a specific SYBR Green-qPCR assay to detect and quantify  
46  
47 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, based on the ITS region. However, although the ITS region  
48  
49 is widely used for the identification of fungi, nowadays, its use for the *Fusarium* genus is not  
50  
51 considered determinant, because of the large diversity of species contained in this genus and the  
52  
53 low capacity to establish differences among very close individuals, as for example between *F.*  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 *oxysporum* and *F. brachygibbosum*. The gene *TEF-1α* has the advantage of being highly  
4  
5 informative at the species level, no non-orthologous copies have been detected, and it can be  
6  
7 aligned completely in the phylogeny of the *Fusarium* genus (Al-Hatmi et al. 2016). Likewise, the  
8  
9 gene that codes for the RPB2 subunit has been widely used in the phylogeny and barcoding of  
10  
11 *Fusarium* (O'Donnell et al. 2013), and, although both loci are one copy, they allow to find  
12  
13 differences among very close species.  
14  
15

16  
17 Soils infested with *Fusarium* affect the normal production by diminishing the yields as  
18  
19 they become deleterious and are no longer adequate, at least, for the affected crop, because of the  
20  
21 way in which *Fusarium* affects the plants. Chemical control alternatives focused on the  
22  
23 integrated management of pests establish as a first step the precise identification of the pathogen  
24  
25 and other involved pests (Katan et al. 2012). In this sense, quantification of the *Fusarium* load in  
26  
27 real time offers the advantage of being able to perform diagnosis and decide, at the moment of  
28  
29 choosing the field and the cultivar, the fungicide to be applied, the amount and date of  
30  
31 application, etc.  
32  
33

34  
35 In this work, it was possible to amplify unique fragments for each one of the three  
36  
37 pathogenic *Fusarium* species, without amplifying a DNA different from the target one. Six pairs  
38  
39 of oligonucleotides were designed to detect the presence of *F. falciforme*, *F. oxysporum*, and *F.*  
40  
41 *brachygibbosum*, by means of end point PCR, and three pairs of oligonucleotides to detect and/or  
42  
43 quantify the presence of those fungi by means of SYBR Green-qPCR. Choosing one or the other  
44  
45 methodology will be in function of factors, like number of samples, expected results, presence or  
46  
47 absence, monitoring of the inoculum during the application of a treatment, etc. The accurate  
48  
49 diagnosis will allow choosing the adequate control method, which will diminish the  
50  
51 environmental impact through the rational use of agrochemical products. According to the  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 literature review, this seems to be the first attempt to simultaneously identify and quantify,  
4  
5 through real time SYBR Green-qPCR, one part of the fungal complex responsible for root rotting  
6  
7 and death of watermelon plants.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 **References**

- 17  
18  
19 Al-Hatmi A. M., Van Den Ende A.H., Stielow J.B., Van Diepeningen A.D., Seifert K.A.,  
20  
21 McCormick W., Assabqui R., Gräfenhan T., De Hoog G.S., and Lévesque C.A. 2016.  
22  
23 Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in  
24  
25 *Fusarium*. Fungal Biology 120:231-245.  
26  
27  
28 Beltrán, R., Vicent, A., García-Jiménez, J., and Armengol, J. 2008. Comparative epidemiology  
29  
30 of *Monosporascus* root rot and vine decline in muskmelon, watermelon, and grafted  
31  
32 watermelon crops. Plant Dis. 92:158-163.  
33  
34  
35 Boughalleb, N., and El Mahjoub, M. 2006. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and *F. oxysporum*  
36  
37 f. sp. *niveum* inoculum densities in Tunisian soils and their effect on watermelon  
38  
39 seedlings. Phytoparasitica 34:149-158.  
40  
41  
42 Choi. J., Park, S. Y., Kim, B. R., Roh, J. H., Oh, I. S., Han, S. S., and Lee, Y. H. 2013.  
43  
44 Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe*  
45  
46 *grisea* Species Complex. PLoS ONE 8(2): e57196.  
47  
48  
49 Elrifro, E. M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., and Klapper, P.E. 2000. Multiplex PCR: optimization  
50  
51 and application in diagnostic virology. Clinical Microbiology Reviews 13:559-570.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Everts, K. L., and Himmelstein, J. C. 2015. *Fusarium* wilt of watermelon: Towards sustainable  
4 management of a re-emerging plant disease. *Crop Prot.* 73:93-99.  
5  
6  
7  
8 Gao, X., Jackson, T. A., Lambert, K., Li, S., Hartman, G. L. and Niblack, T. 2004. Detection and  
9 Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with Real-Time  
10 Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 88:1372-1380.  
11  
12  
13  
14 Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. 1997. Multiplex  
15 PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23:504-511.  
16  
17  
18  
19 Katan, J., Shtienberg, D., and Gamliel, A. 2012. The integrated management concept in the  
20 context of soil borne pathogens and soil disinfestation. Pages 91-97 in: *Soil Solarization:*  
21 *Theory and Practice.* A. Gamliel and J. Katan, Eds. The American Phytopathological  
22 Society, St. Paul, MN.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29 Markoulatos, P., Sifakas, N., Moncany, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A  
30 practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 47-51. *Monosporascus* root rot and vine  
31 decline in muskmelon, watermelon, and grafted watermelon crops. *Plant Dis.* 92:158-163.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- 219 Everts, K. L., and Himmelstein, J. C. 2015. *Fusarium* wilt of watermelon: Towards sustainable  
220 management of a re-emerging plant disease. *Crop Prot.* 73:93-99.  
221  
222  
223  
224 Gao, X., Jackson, T. A., Lambert, K., Li, S., Hartman, G. L. and Niblack, T. 2004. Detection and  
225 Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with Real-Time  
226 Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 88:1372-1380.  
227  
228  
229  
230 Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. 1997. Multiplex  
231 PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23:504-511.  
232  
233  
234  
235 Katan, J., Shtienberg, D., and Gamliel, A. 2012. The integrated management concept in the  
236 context of soil borne pathogens and soil disinfestation. Pages 91-97 in: *Soil Solarization:*  
237 *Theory and Practice.* A. Gamliel and J. Katan, Eds. The American Phytopathological  
238 Society, St. Paul, MN.  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245 Markoulatos, P., Sifakas, N., Moncany, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A  
246 practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 47-51. *Monosporascus* root rot and vine  
247 decline in muskmelon, watermelon, and grafted watermelon crops. *Plant Dis.* 92:158-163.  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

- 1  
2  
3 Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho M. A., Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar S. F.,  
4  
5 Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán L. E., and Meza-Moller. 2018. Multilocus  
6  
7 phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora,  
8  
9 Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36:233-255.  
10  
11  
12 SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agrícola por cultivo.  
13  
14 [2017-02-14]. [http:// www.siap.gob.mx/](http://www.siap.gob.mx/).  
15  
16  
17 Sint, D., Raso, L., and Traugott, M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer  
18  
19 efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*  
20  
21 3:898-905.  
22  
23  
24 Stanghellini, M. E., Mohammadi, M. Mathews, D. M., and Adkins, S. 2014. First report of vine  
25  
26 decline of mature watermelon plants caused by *Olpidium bornovanus*. *Plant Dis.* 98:852.  
27  
28  
29 Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Iriny, L., Smits, D., Renfurm, R.,  
30  
31 Verkley, G. J., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen,  
32  
33 L., Favel, A., Al-Hatmi, A. M., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraken, J., Lombard, L.,  
34  
35 Quaedvlieg, W., Binder, M., Vaas, L. A., Vu, D., Yurkov, A., Begerow, D., Roehl, O.,  
36  
37 Guerreiro, M., Fonseca, A., Samerpitak, K., van Diepeningen, A. D., Dolatabadi, S.,  
38  
39 Moreno, L. F., Casaregola, S., Mallet, S., Jacques, N., Roscini, L., Egidi, E., Bizet, C.,  
40  
41 Garcia-Hermoso, D., Martin, M. P., Deng, S., Groenewald, J. Z., Boekhout, T., de Beer,  
42  
43 Z. W., Barnes, I., Duong, T. A., Wingfield, M. J., de Hoog, G. S., Crous, P. W., Lewis, C.  
44  
45 T., Hambleton, S., Moussa, T. A., Al-Zahrani, H. S., Almaghribi, O. A., Louis-Seize, G.,  
46  
47 Assabgui, R., McCormick, W., Omer, G., Dukik, K., Cardinali, G., Eberhardt, U., de  
48  
49 Vries, M., Robert, V. 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia-Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 35:242-263.

Taylor, J.W., and Fisher, M.C. 2003. Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6:351-356.

Westphal, A., Xing, L., and Goodwin, S. B. 2011. Mature watermelon vine decline: Suppression with fumigants of a soil-borne problem and association with *Rhizopycnis vagum*. *Crop Prot.* 30:111-117.

Yli-Mattila T., Nayaka S.C., Venkataramana M., and Yörük E. 2017, Multiplex detection of *Fusarium* species. In: Moretti A., Susca A. (eds) *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, Vol 1542. Humana Press, New York, NY.

Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y., Zheng, X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. *FEMS Microbiology Letters* 249:39-47.

Zitter, T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. Eds. 1996. *Compendium of Cucurbit Diseases*. 1996. APS Press. The American Phytopathological Society.

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Specific primers designed to detect the presence of *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum* causing root rot in watermelon.

| Species              | Name      | Sequence 5'-3'                   | Locus         | Size (bp) | Ta (°C) | Fc (mM) |
|----------------------|-----------|----------------------------------|---------------|-----------|---------|---------|
| <i>F. falciforme</i> | Ff_EF-f   | CAC CGT AAG TCA<br>AAC CCT CAT C | <i>TEF-1α</i> | 621       | 63      | 0.075   |
|                      | Ff_EF-r   | GGG CGT CTG TTG<br>ATT GTT AGT   |               |           |         | 0.075   |
|                      | Ff_qEF-f* | CAA CAT CTA CAG<br>ACC GGT CAC   | <i>TEF-1α</i> | 129       | 60      | 0.2     |
|                      | Ff_qEF-r* | GGA GGG AAT TCG<br>TTG TGG AAT A |               |           |         | 0.2     |
|                      | Ff_RPB2-f | AGT ATG AGG TGT<br>CGC TTG TTC   | <i>RPB2</i>   | 360       | 63      | 0.075   |
|                      | Ff_RPB2-r | CGT CCG TGT TAT                  |               |           |         | 0.075   |

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

|                          |             |                                  |                                 |     |    |     |
|--------------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|-----|----|-----|
|                          |             | CGT CAT CTA C                    |                                 |     |    |     |
| <i>F. oxysporum</i>      | Fo_EF-f     | CTC TCC TCG ACA<br>ATG AGC TT    | <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> | 180 | 61 | 0.8 |
|                          | Fo_EF-r     | CGA TCG AAG GGA<br>AAG TGA CTA A |                                 |     |    | 0.8 |
|                          | Fo_RPB2-f   | GTG TCC TGC CGA<br>AAC ACC T     | <i>RPB2</i>                     | 593 | 61 | 0.8 |
|                          | Fo_RPB2-r   | GTG TCC TGC CGA<br>AAC ACC T     |                                 |     |    | 0.8 |
|                          | Fo_qRPB2-f* | ACC CGT CTT TAC<br>AGT TCA TCA G | <i>RPB2</i>                     | 153 | 60 | 0.6 |
|                          | Fo_qRPB2-r* | ATC AAG CCA TCC<br>CAT CCA AA    |                                 |     |    | 0.6 |
| <i>F. brachygibbosum</i> | Fb_EF-f     | CCC TCT TCC CAC<br>AGT CAT ATT C | <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> | 267 | 63 | 0.1 |
|                          | Fb_EF-r     | GTC TGA AGG GCG<br>TGT TAG TAT G |                                 |     |    | 0.1 |
|                          | Fb_qEF-f*   | CCA TCA TTC GAC<br>TCG CTC T     | <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> | 155 | 60 | 1.0 |

|  |           |                                  |             |     |    |     |
|--|-----------|----------------------------------|-------------|-----|----|-----|
|  | Fb_qEF-r* | GAA TAT GAC TGT<br>GGG AAG       |             |     |    | 1.0 |
|  | Fb_RPB2-f | ACA AGA TAC CCT<br>CAC GCA AC    | <i>RPB2</i> | 447 | 63 | 0.1 |
|  | Fb_RPB2-r | ATC CTG CTT CTG<br>TTC ACG ATA G |             |     |    | 0.1 |

\* = Primers for SYBR Green-qPCR.

T<sub>a</sub> = Alignment temperature.

F<sub>c</sub> = Final concentration of the primer in the reaction mixture.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 1. Alignment of sequences in the segments used for the design of specific primers for *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, and *F. oxysporum*, (A): TEF-1a and (B): RPB2 (B). The sequence corresponding to *Trichoderma harzianum* has been included to verify *in silico* specificity. Identical nucleotides are marked with an asterisk. Missing nucleotides are indicated with dashes. All primers are in bold and those of qPCR are underlined.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 2. Specific fragments of DNA amplified with the three pairs of primers designed for each *Fusarium* species, according to Table 1. Lane 1: *F. falciforme*, Lane 2: *F. oxysporum*, Lane 3: *F. brachygibbosum*, Lanes 4-7: *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Ceratobasidium* sp. and DEPC-water as negative controls, respectively. Lane 8: DNA marker.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 3. Duplex PCR assay using two pairs of primers of loci *TEF-1 $\alpha$*  and *RPB2* to detect the presence of each *Fusarium* sp. in a mixture of fungal DNA. A) PCR products amplified with primers (a) Ff\_EF-f and Ff\_EF-r and (b) Ff\_RPB2-f and Ff\_RPB2-r. B) PCR products amplified with primers (a) Fo\_EF-f and Fo\_EF-r and (b) Fo\_RPB2-f and Fo\_RPB2-r. C) PCR products amplified with primers (a) Fb\_EF-f and Fb\_EF-r and (b) Fb\_RPB2-f and Fb\_RPB2-r. Lane 1: *F. falciforme*, Lane 2: *F. oxysporum*, Lane 3: *F. brachygibbosum*, Lanes 4-7: *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Ceratobasidium* sp. and DEPC-water, as negative controls respectively. Lane 8: DNA marker.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 4. Triplex PCR amplifying a specific fragment of gene *RPB2* for the simultaneous detection of three *Fusarium* species in the same reaction tube. Lane 1: (a) *F. oxysporum* = 593 bp, (b) *F. brachygibbosum* = 447 bp, and (c) *F. falciforme* = 360 bp. Lane 2: DEPC water. Lane 3: DNA marker.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 5. Construction of *F. falciforme* standard curve by SYBR Green-qPCR. A: Amplification curve. 1-5, Ten-fold dilutions of total DNA (5 ng to 50 fg); 6, negative control; 7, Baseline. B: Melt curve (peak temperature at 84.81°C), C: Standard curve.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 6. Construction of *F. oxysporum* standard curve by SYBR Green-qPCR. A: Amplification curve. 1-5, Ten-fold dilutions of total DNA (100 ng to 0.01 pg); 6, negative control; 7, Baseline. B: Melt curve (peak temperature at 84.37°C). C: Standard curve.

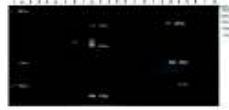
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Fig. 7. Construction of *F. brachygibbosum* standard curve by SYBR Green-qPCR. A: Amplification curve. 1-5, Ten-fold dilutions of total DNA (100 ng to 0.01 pg); 6, negative control; 7, Baseline. B: Melt curve (peak temperature at 86.62°C). C: Standard curve.





- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60



370x114mm (144 x 144 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Fig. 3. Duplex PCR assay using two pairs of primers of loci TEF-1 $\square$  and RPB2 to detect the presence of each *Fusarium* sp. in a mixture of fungal DNA. A) PCR products amplified with primers (a) Ff\_EF-f and Ff\_EF-r and (b) Ff\_RPB2-f and Ff\_RPB2-r. B) PCR products amplified with primers (a) Fo\_EF-f and Fo\_EF-r and (b) Fo\_RPB2-f and Fo\_RPB2-r. C) PCR products amplified with primers (a) Fb\_EF-f and Fb\_EF-r and (b) Fb\_RPB2-f and Fb\_RPB2-r. Lane 1: *F. falciforme*, Lane 2: *F. oxysporum*, Lane 3: *F. brachygibbosum*, Lanes 4-7: *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Ceratobasidium* sp. and DEPC-water, as negative controls respectively. Lane 8: DNA marker.

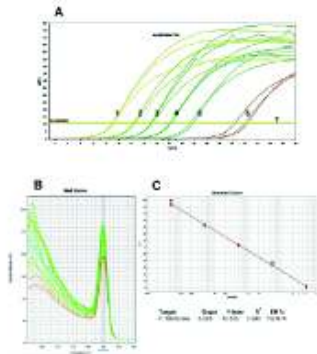
370x114mm (144 x 144 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



370x114mm (144 x 144 DPI)

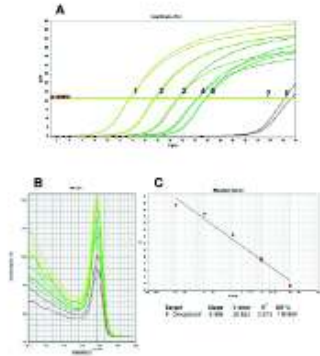
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



370x176mm (144 x 144 DPI)

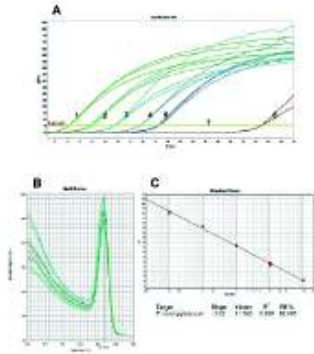


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



370x176mm (144 x 144 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



370x175mm (144 x 144 DPI)

## V. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos y publicados en los manuscritos generados en la presente tesis permitieron establecer que individualmente o en forma conjunta, al menos cinco especies diferentes de hongos causan pudrición radicular y eventualmente la muerte de plantas de sandía. En primera instancia, el análisis de las características morfológicas de los aislados permitió identificar a dos géneros de hongos fitopatógenos: *Rhizoctonia* y *Fusarium*.

Posteriormente, mediante el análisis filogenético de secuencias concatenadas de ADN (*ITS* y *RPB2*) se dilucidó que el grupo de aislados detectados como *Rhizoctonia* estaba conformado por los grupos anastomósicos AG-A y AG-F de *Rhizoctonia* binucleada (teleomorfo: *Ceratobasidium* sp.), además de AG-4 delimitado como *Thanatephorus praticola* (Mordue *et al.*, 1989; González *et al.*, 2016) y AG-6 de *Rhizoctonia solani* (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*).

AG-F ha sido reportado como causante de pudrición radicular en sandía en Arizona, EUA (Nischwitz *et al.*, 2013) e Italia (Aiello *et al.*, 2012). También es el agente causal de la enfermedad en fresa (Sharon *et al.*, 2007), cempaxúchitl (Saroj *et al.*, 2013) y pistache (Alaei *et al.*, 2017). Hasta la fecha no existían registros acerca de la patogenicidad de *Ceratobasidium* AG-A en sandía, pero sí en remolacha azucarera y manzano (Wang y Wu, 2012).

Aiello *et al.* (2012) encontró que *T. praticola* y *Ceratobasidium* sp. AG-F forman parte de un complejo de hongos que causan pudrición de raíz y declive de plantaciones de sandía en etapa de producción en Italia.

Los síntomas en raíces y tallos de plantas infectadas con los aislados de *Rhizoctonia* binucleada y polinucleada fueron similares: lesiones localizadas café-rojizas y ligeramente hundidas en la base del tallo y de 0.2 a 2.0 cm de largo; llegando a afectar hasta un 90% de sistema radicular (Meza-Möller *et al.*, 2014).

El análisis filogenético de los aislados de *Fusarium* (con fragmentos de secuencias de los genes: *ITS*, *TEF-1 $\alpha$*  y *RPB2*) permitió identificar la presencia de *F. falciforme*, *F. oxysporum* y *F. brachygibbosum*.

La especie predominante fue *F. falciforme*, inicialmente, este hongo fue identificado como la morfoespecie politípica *F. solani*; sin embargo, en el árbol filogenético formó un clado separado dentro del *Fusarium solani* Species Complex (FSSC). Siendo una de las especies crípticas del Complejo. *F. falciforme* ha sido reportado como agente causal de marchitamiento y pudrición de raíz en muy pocos cultivos.

Se ha reportado que *F. oxysporum* f. sp. *niveum* perteneciente al *F. oxysporum* Species Complex (FOSC), es el principal responsable de marchitez vascular y muerte de plantas de sandía causantes en el mundo. Los miembros de FOSC afectan a más de 100 diferentes especies vegetales (López-Mondéjar *et al.*, 2012).

Como producto de este trabajo, *F. brachygibbosum* perteneciente a *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSSC) fue reportado por primera vez como agente patógeno, causante de marchitez en plantas de sandía (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). Los síntomas presentados en sandía se parecen mucho a los ocasionados por la invasión de *F. oxysporum*. Este hongo ha demostrado que además de causar marchitez vascular, puede ocasionar también podredumbre, canchales y muerte regresiva en diferentes cultivos por lo que es de suma importancia describir los morfotipos presentes.

Ante la falta de información alrededor del complejo de hongos causantes de la pudrición radicular en los cultivos de sandía en Sonora y dado que las técnicas de identificación morfológica aún son ampliamente utilizadas, se realizó una descripción y comparación sobre las características macroscópicas y microscópicas distintivas de las diferentes especies de *Fusarium* encontradas.

Se encontró que los morfotipos *F. brachygibbosum* encontrados, presentaron clamidosporas sencillas o dobles, de pared gruesa, intercalares y terminales. Monofíalides cortas y escasas polifíalides. Macroconidios con células apicales en ligera forma de gancho y células basales con forma típica o ligera forma de pie, concordando con lo citado por Padwick (1945). El mayor grosor de paredes fue distintivo en las clamidosporas de *F. brachygibbosum*. La morfología de los macroconidios fue diferente en las tres especies. Una característica distintiva en los morfotipos de *F. falciforme* fueron las monofíalides largas y delgadas; mientras que en los de *F. oxysporum* fue la ausencia de septos en los microconidios.



El color de la base del medio, el tipo de células conidiógenas, además de la morfología y tamaño de las macroconidias pueden hacer que *F. brachygibbosum* sea identificado erróneamente como *F. oxysporum*, que se considera el más común en la mayoría de los cultivos de la región. El grosor en la pared de las clamidosporas y la ausencia o presencia de septos son las características que pueden diferenciar entre las dos especies.

Los posibles errores y lo tardado de la identificación basada en el cultivo y el análisis morfológico de los hongos fitopatógenos hacen que se incremente la necesidad de desarrollar protocolos de identificación y cuantificación rápida, en ese sentido las herramientas de PCR múltiple y qPCR cuantitativa, son las opciones más eficientes.

Las técnicas de PCR múltiple y PCR en tiempo real se han utilizado para detectar la presencia y para cuantificar, respectivamente, complejos de especies de *Fusarium* (Yli-Mattila *et al.*, 2017).

La precisión y la rapidez del diagnóstico se logran mediante el uso de iniciadores capaces de amplificar dos o más fragmentos de ADN específicos en el genoma de una especie. Dichos fragmentos funcionan como marcadores moleculares útiles para la identificación de dicha especie. Así, el diseño de oligonucleótidos que generen fragmentos amplificados de diferentes tamaños en varias especies asociadas a una enfermedad hace posible detectar la presencia de dichas especies en forma simultánea.

La PCR en tiempo real provee información más precisa que la PCR punto final y en menor tiempo, ya que prescinde del procesamiento posterior a la amplificación. La tecnología desarrollada con los fluoróforos que se intercalan en el ADN, como el SYBR Green, ofrece la ventaja del procesamiento de un gran número de muestras en un tiempo máximo de 3 h.

Los marcadores elegidos han sido previamente estudiados en filogenia de *Fusarium*. El gen *TEF-1 $\alpha$*  tiene la ventaja que es altamente informativo a nivel de especie, no se han detectado copias no ortólogas, y es completamente alineable en la filogenia de este género (Al-Hatmi *et al.*, 2016). De igual manera, el gen que codifica para la subunidad RPB2 ha sido ampliamente utilizado en filogenia y código de barras de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2013) y aunque ambos loci son de una sola copia, permiten encontrar diferencias entre especies muy cercanas. La cuantificación de la carga de *Fusarium* en tiempo real ofrece la ventaja de poder realizar el

diagnóstico y tomar las decisiones al momento de elegir el campo, el cultivar, el fungicida a aplicar, la cantidad y fecha de aplicación, etc.

De acuerdo a la revisión de literatura, parece ser que este es el primer intento sobre la identificación simultánea y cuantificación por PCR tiempo real SYBR Green de una parte del complejo de hongos que causa pudrición en raíz y muerte de plantas de sandía.

Finalmente, de acuerdo a comunicaciones personales con responsables del área de producción de plántulas de sandía (Ing. Leonel Ibarra Chaparro, Ing. Agramón, Ing. Wendy) las variedades que se cultivan en Sonora son: Joy Ride, Summer Breeze, Tailgate (Seminis® de Bayer Group), Excursion, Fascination, Sugar Red, Sweet Dawn (Syngenta®), 7187, 7197 y Embassy (Nunhem®). La información mostrada en las páginas web de las compañías establece que la resistencia de estas variedades es principalmente, contra *F. oxysporum*. En este trabajo, de los 45 aislados obtenidos, sólo dos correspondieron a *F. oxysporum*, ambos provenientes de la misma zona de muestreo. Esto explica la alta incidencia de enfermedades radiculares y vasculares debido a que estas enfermedades son ocasionadas por un complejo de hongos.

## VI. CONCLUSIONES

- La pudrición de raíz, marchitez, colapso y muerte en plantas de sandía en la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas (Sonora) es causada por un complejo de hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*.
- *Fusarium oxysporum* f sp *niveum* no es el principal agente causal de marchitez vascular y muerte de plantas en la zona de estudio.
- *Fusarium falciforme*, *F. brachygibbosum*, *Thanatephorus praticola* (*Rhizoctonia solani* AG-4) y *Ceratobasidium* spp. son reportados por primera vez en el presente trabajo como causantes de pudrición radicular y marchitez de plantas de sandía.
- Es posible identificar grupos anastomósicos de especies de hongos pertenecientes a la familia *Ceratobasidiaceae* mediante filogenia multilocus sin necesidad de contar con los cultivos tipo.
- Características morfológicas microscópicas como el grosor de paredes en las clamidosporas, la morfología de los macroconidios, el tipo de células conidiógenas y la presencia o ausencia de septos en microconidios son lo suficientemente diferentes entre *F. brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* y pueden servir para diferenciarlos.
- El porcentaje de daño causado por cada especie encontrada y definida por filogenia molecular y morfología es diferente.

## VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar y continuar con el diagnóstico con PCR múltiple y qPCR en la temporada otoño-invierno y aumentando el número de campos muestreados llevando cuidadosamente el registro de las variedades cultivadas, incluidas los portainjertos, aun en ausencia de síntomas; además, monitorear el comportamiento del inóculo ante las medidas de control empleadas en cada campo.
- Analizar con los protocolos diseñados para la detección y cuantificación de patógenos causantes de pudrición radicular las variedades de semillas más utilizadas en la región con el objetivo de rastrear y determinar el origen del inóculo.
- Realizar pruebas específicas con aislados representativos de cada especie y cada grupo anastomósico con los fungicidas comerciales existentes para determinar cuál es la dosis más efectiva para cada uno de ellos.
- Realizar análisis filogenéticos orientados a identificar las razas de *Fusarium oxysporum* presentes en los campos agrícolas de la región para determinar los cultivares o variedades de sandía susceptibles.
- Buscar otros morfotipos de *Fusarium brachygibbosum* para incrementar el conocimiento acerca de la morfología de la especie.
- Estandarizar protocolos de PCR múltiple y qPCR para los hongos patógenos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia* y *Ceratobasidium*.
- Cuantificar por qPCR en tiempo real la carga fúngica de las especies de hongos patógenos a partir de suelo y planta con el fin de determinar los niveles de inóculo a los cuales se presenta la enfermedad.
- Determinar la influencia de factores edáficos (tipo de suelo, textura, pH, conductividad eléctrica, contenido de humedad, temperatura, niveles de nutrientes y microbiología del suelo) en la variabilidad de poblaciones de los hongos patógenos encontrados.
- Realizar estudios del microbioma del suelo y aislar agentes de control biológico de plantas sanas de sandía.



- Establecer una colección de cultivos con organismos patógenos aislados para contar con cultivos tipo en investigaciones posteriores que sean susceptibles de ser manejados con agentes de control biológico.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2011. Plant pathology. Academic Press. 952 pp.
- Aiello, D., Vitale, A., Hyakumachi, M. y Polizzi, G. 2012. Molecular characterization and pathogenicity of binucleate *Rhizoctonia* AG-F associated to the watermelon vine decline in Italy. European Journal of Plant Pathology 134:161-165. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9973-9>
- Al-Hatmi A, M. S., Gerrits Van Den Ende, A. H. G., Stielow, J. B., Van Diepeningen, A. D., Seifert, K. A., McCormick, W., Assabqui, R., Gräfenhan, T., De Hoog, G. S. y Levesque, C. A. 2016. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogen in *Fusarium*. Fungal Biology 120:231-245. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.006>
- Andersen, T. F., Stalpers, J. A. 1994. A checklist of *Rhizoctonia* epithets. Mycotaxon. 51:437-457.
- Boughalleb, N. y El Mahjoub, M. 2006. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* inoculum densities in Tunisian soils and their effect on watermelon seedlings. Phytoparasitica 34:149-158.
- Bulathsinghala, A. T., Shaw, I. C. 2014. The toxic chemistry of methyl bromide. Human and experimental toxicology. 33:81-91.
- Chilosi, G., Reda, R., Oleandri, M. P., Camele, I., Altieri, L., Montuschi, C., Languasco, V., Rossi, G. E., Agosteo, C., Macri, A., Carlucci, F., Lops, M., Mucci, M.L., Raimondo y Frisullo. 2008. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. EPPO Bulletin, 38, 147–154.
- Coleman, J. J. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. Molecular Plant Pathology 17:146-158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Cubeta, M. A. y Vilgalys, R. 2000. *Rhizoctonia*. In: Lederberg, J., Editor. Encyclopedia of Microbiology. Vol. 4. San Diego. Academic Press. p. 109-116.
- Elias, K. S., Zamir, D., Lichtman-Pleban, T., Katan, T. 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. Mol. Plant Microbe Interact. 6:565-572.
- Farr, D. F., Rossman, A. Y., Palm, M. E. McCray, E. B. 2005. Fungal Database. ARS, USDA: Systematic Botany and Mycology Laboratory; <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Fernández-Herrera E, Uribe-Rivera SE, Guerrero-Ruíz JC, Rueda-Puente EO. 2013. Hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de raíz y cuello en sandía en la costa de Hermosillo, Sonora. Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali B.C., México.
- Food and Agriculture Organization. 2016. Estadísticas. Disponible en línea: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> (consulta diciembre 2018).

- García-Vázquez, A., García-Salazar, J. A., Guzmán-Soria, E., Portillo Vázquez, M., Fortis-Hernández, M. 2011. *Región y Sociedad*. 52:239-260.
- Gordon, T. R. and Martyn, R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*.35:111-128. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.111>
- Harris, K.R., Wechter, W.P. y Levi, A. 2009. Isolation, sequence analysis, and linkage mapping of NBS-LRR disease resistance gene analogs in Watermelon. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 134:649-657.
- Infantino, A., Carlucci, A., Pucci, N., Ciuffreda, G., Montuschi, C., Lops, F., Uccelletti, A., Mucci, M., Frisullo, S. 2004. Fungi causing root rots and collapse of cucurbits in Italy. *Petria*. 14:77-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x>
- Jiang, J. H., Lee, Y. I., Cubeta, M. A., Chen, L. C. 2015. Characterization and colonization of endomycorrhizal *Rhizoctonia* fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*. 5:431-445. doi: 10.1007/s00572-014-0616-1
- Krikun, J., Orion, D., Nachmias, A. y Reuveni, R. 1982. The role of soilborne pathogens under conditions of intensive agricultura. *Phytoparasitica*. 10:247:258. DOI: 10.1007/BF03023966
- Levi, A., Thomas, C.E., Wehner, T.C. y Zhang, X. 2001. Low genetic diversity indicated the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. *HortScience* 36:1096-1101. DOI:10.21273/HORTSCI.36.6.1096
- López-Elías, J., Pacheco-Ayala F., Huez-López, M. A., Rodríguez, J. C., Jiménez-León, J. y Garza-Ortega, S. 2010. Sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) injertada sobre diferentes portainjertos de calabaza (*Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*). *Biotecnia*. XII: 3-10. Disponible en línea: <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/87>
- Masuhara, G., Katsuya, K., Yamaguchi, K. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. amoena. *Mycological Ressearch*. 97:746-752. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80156-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80156-1)
- Nelson, P. E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*. 7:479. DOI: 10.1128/CMR.7.4.479
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., Lee, T. V., Moretti, A., Kang, S., Kim, H. S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S., Sutton, D. A., Skovgaard, K., Ploetz, R., Corby, K. H., Elliott, M., Davis, M., Sarver, B. A. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol*. 46:936-948. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.006>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America 95:2044-2049. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/>
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, P., Ward, T. J., Frandsen, R. J. N., Lysoe, E., Rehner, S. A., Aoki, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Kang, S. y Geiser, D. M. 2013. Phylogenetic analysis of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52:20-31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- O'Donnell, K., Sarver, B. A., Brandt, M., Chang, D. C., Noble-Wang, J., Park, B. J., Sutton, D. A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A., Geiser, D. M., Ward, T. J. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol.* 45:2235-2248. DOI: 10.1128/JCM.00533-07
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M. G., Brandt, M. E., Zhang, N., Geiser, D. M., 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol.* 46:2477-2490. DOI: 10.1128/JCM.02371-07
- Padwick GW. 1945. Notes on Indian fungi III. *Mycological Papers.* 12:1-15.
- Roberts, P. 1999. *Rhizoctonia*-forming fungi: A taxonomic guide. Royal Botanic Gardens.
- Sabori-Palma, R., Grajeda-Grajeda, J., Fu-Castillo, A. A. 2015. Sandía. En *Agenda técnica agrícola Sonora.* 2ª. Ed. ©Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Shan, L. Y., Cui, W. Y., Zhang, D. D., Zhang, J., Ma, N. N., Bao, Y. M., Dai, X. F. y Guo, W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101(5): 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Sousa, E. S., Melo, M. P., Mota, J. M., Sousa, E. M. J., Beserra, J. E. A. y Matos, K. S. 2017. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Disease* 101:1954. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0657-PDN>
- Stalpers, J. A., Andersen, T. F. 1996. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* s.l. In: Sneha B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijkstra G (eds), *Rhizoctonia* Species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 49-63.
- Taylor, J.W. y Fisher, M.C. 2003. Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6:351-356. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00088-2)
- Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S. y Fisher, M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics Biology* 31:21-32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>

- Vilgalys, R., Cubeta, M. A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annual Review of Phytopathology. 32:135-155. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.001031>
- Yli-Mattila T., Nayaka S.C., Venkataramana M., and Yörük E. 2017. Multiplex detection of *Fusarium* species. In: Moretti A., Susca A. (eds) Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology. Vol 1542. Humana Press, New York, NY.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, F., Nalim, A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A. and Geiser, D. M. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. Journal of Clinical Microbiology. 44:2186-2190. doi:10.1128/JCM.00120-06
- Zhang, Z., Zhang, J., Wang, Y., Zheng, X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiol Lett. 249:39-47. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.057>
- Zhou XG, Everts KL and Bruton BD. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. Plant Disease 94:92-98. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0092>.