

# First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 1 as causal agent of vascular wilt of watermelon in Mexico

## Primer reporte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* raza 1 como agente causal de la marchitez vascular de la sandía en México

Irasema Vargas-Arispuro<sup>1</sup>; Irene Iliana Ramírez-Bustos<sup>2</sup>; Alda Alejandra Arratia-Castro<sup>3</sup>; Daniel Bárcena-Santana<sup>4</sup>; Ernesto Fernández-Herrera<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, núm. 46, col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, C. P. 83304, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad Estatal de Sonora. Av. Ley Federal del Trabajo, s/n, Hermosillo, Sonora, C. P. 83000, MÉXICO.

<sup>3</sup>Universidad Politécnica de Pénjamo. Carr. Irapuato-La Piedad km 44, Pénjamo, Guanajuato, C. P. 36921, MÉXICO.

<sup>4</sup>Universidad Estatal de Sonora. Blvd. Manlio Fabio Beltrones 810, Bugambillas, Navojoa, Sonora, C. P. 85875, MÉXICO.

<sup>5</sup>Universidad de Sonora. Carr. Bahía de Kino km 21, Hermosillo, Sonora, C. P. 83323, MÉXICO.

\*Corresponding author: ernesto.fernandez@unison.mx, tel. 6625 96 02 97.

### Abstract

Vascular wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [Fon]) is the main fungal disease of watermelon crops worldwide and can be caused by any of the four known races of this fungus (race 0, 1, 2 and 3). In Mexico, there are no reports of the presence of any of these races. The presence of plants with wilt and vascular necrosis has been observed in commercial watermelon plantations in the municipality of Hermosillo, Sonora, Mexico, mainly during the spring-summer growing seasons. The aim of this study was to identify the *Fon* race causing vascular wilt in watermelon plants in Hermosillo, Sonora. Three fungal isolates were collected from symptomatic plants. Based on their morphological characteristics, DNA amplification of the isolates (with specific primers Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R and FNR3-F/FNR3-R, which allow differentiating *Fon* race 1, 2 and 3) and inoculation into three differential watermelon cultivars, the three isolates (UESFON01, UESFON02 and UESFON03) were identified as *F. o. f. sp. niveum* race 1. To our knowledge, this is the first report where *F. o. f. sp. niveum* race 1 is identified as the causal agent of wilt, vascular necrosis and plant death in watermelon crops in Mexico.

**Keywords:** *Citrullus lanatus*, races, Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R, FNR3-F/FNR3-R.

### Resumen

La marchitez vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [Fon]) es la principal enfermedad fúngica del cultivo de sandía en el mundo, y puede ser causada por alguna de las cuatro razas conocidas de este hongo (raza 0, 1, 2 y 3). En México, no existen reportes de la presencia de alguna de estas razas. La presencia de plantas con marchitez y necrosis vascular se ha observado en plantaciones comerciales de sandía en el municipio de Hermosillo, Sonora, México, principalmente durante los ciclos de cultivo de primavera-verano. El objetivo de este estudio fue identificar la raza de *Fon* causante de la marchitez vascular en plantas de sandía en Hermosillo, Sonora. Se colectaron tres aislados fúngicos de plantas sintomáticas. Con base en sus características morfológicas, la amplificación del DNA de los aislados (con los primers específicos Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R y FNR3-F/FNR3-R, que permiten diferenciar la raza 1, 2 y 3 de *Fon*) y la inoculación en tres cultivares de sandía diferenciales, los tres aislados (UESFON01, UESFON02 y UESFON03) se identificaron como *F. o. f. sp. niveum* raza 1. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte donde *F. o. f. sp. niveum* raza 1 es identificado como agente causal de la marchitez, necrosis vascular y muerte de plantas en el cultivo de sandía en México.

**Palabras clave:** *Citrullus lanatus*, razas, Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R, FNR3-F/FNR3-R.



## Introduction

Mexico is one of the top 10 watermelon-producing countries in the world, with a production of 1,362,393 t and an area of 40,000 ha (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP, 2021]). Wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*) is the main fungal disease affecting watermelon crops worldwide and can cause losses of up to 100 % when cultivars with resistance to the fungus are not used (Dau et al., 2009). This disease is characterized by presenting chlorosis, wilting of foliage, necrosis of vascular tissue and plant death (Callaghan et al., 2016; Fernández-Herrera, González-Soto, & Ramírez-Bustos, 2021). This pathogen survives in the soil for many years in the form of chlamydospores, which hinders watermelon cultivation in fields infested with this fungus (Kang, Demers, Jimenez-Gasco, & Rep, 2014), or it can infect seeds latently, which can be an important inoculum source and contribute to severe disease outbreaks (Petkar & Ji, 2017).

*Fon* has four races (0, 1, 2 and 3), all of which are present in the United States, although in many other countries, including Mexico, the distribution and prevalence of these races is still unknown. The traditional method for the identification of *Fon* races is through inoculation of differential cultivars; however, this method is time-consuming, expensive and inaccurate (Everts & Himmelstein, 2015; Hudson et al., 2021), as several factors can have a significant effect on pathogen virulence (such as temperature, moisture, spore concentration, seedling age, etc.). In addition, certain differential cultivars such as Calhoun Gray and PI-296341-FR are not commercially available, although Calhoun Gray can be substituted for Dixielee (Kleczewski & Egel, 2011; Zhou & Everts, 2003).

In contrast, molecular identification by PCR has advantages over traditional diagnostic methods in that it is faster, more sensitive and more reliable. Recently, Hudson et al. (2021) developed a primer pair that can differentiate *Fon* race 3 from races 1 and 2, and by using two other oligonucleotide pairs (Lin et al., 2010; Niu et al., 2016) races 1, 2 and 3 can be differentiated. However, that study did not include race 0 isolates, so it has yet to be identified based on inoculation of differential plants. A rapid and reliable identification of pathogens, or correct disease diagnosis, is an essential step in integrated disease management of agricultural crops (Lin et al., 2010).

In recent years, mainly during the spring-summer growing seasons, plants with symptoms similar to those described for *F. oxysporum* have been observed in commercial watermelon plantations in Hermosillo, Sonora, Mexico. Therefore, the aim of this research

## Introducción

México es uno de los 10 principales países productores de sandías en el mundo, con una producción de 1,362,393 t y una superficie de 40,000 ha (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP, 2021]). La marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*) es la principal enfermedad fúngica que afecta al cultivo de sandía en todo el mundo, y puede causar pérdidas hasta del 100 % cuando no se utilizan cultivares con resistencia al hongo (Dau et al., 2009). Esta enfermedad se caracteriza por presentar clorosis, marchitez del follaje, necrosis del tejido vascular y muerte de las plantas (Callaghan et al., 2016; Fernández-Herrera, González-Soto, & Ramírez-Bustos, 2021). Este patógeno sobrevive en el suelo durante muchos años en forma de clamidospora, lo cual dificulta el cultivo de sandía en campos infestados con este hongo (Kang, Demers, Jimenez-Gasco, & Rep, 2014), o puede infectar a las semillas de forma latente, lo que puede ser una importante fuente de inóculo y contribuir a brotes severos de la enfermedad (Petkar & Ji, 2017).

*Fon* tiene cuatro razas (0, 1, 2 y 3), las cuales están presentes en Estados Unidos, aunque en muchos otros países, incluido México, aún se desconoce la distribución y prevalencia de estas razas. El método tradicional para la identificación de razas de *Fon* es a través de la inoculación de cultivares diferenciales; no obstante, este método es largo, caro e inexacto (Everts & Himmelstein, 2015; Hudson et al., 2021), pues diversos factores pueden tener un efecto significativo en la virulencia del patógeno (como la temperatura, la humedad, la concentración de esporas, la edad de plántulas, etc.). Además, ciertos cultivares diferenciales como Calhoun Gray y PI-296341-FR no están disponibles comercialmente, aunque Calhoun Gray puede ser sustituido por Dixielee (Kleczewski & Egel, 2011; Zhou & Everts, 2003).

Por el contrario, la identificación molecular por PCR presenta ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico, ya que es más rápida, sensible y confiable. Recientemente, Hudson et al. (2021) desarrollaron un par de primers que puede diferenciar la raza 3 de las razas 1 y 2 de *Fon*, y mediante el uso de otros dos pares de oligonucleótidos (Lin et al., 2010; Niu et al., 2016) se pueden diferenciar las razas 1, 2 y 3. Sin embargo, en ese estudio no se incluyeron aislamientos de la raza 0, por lo que aún se debe identificar con base en la inoculación de plantas diferenciales. La identificación rápida y confiable de los patógenos, o el diagnóstico correcto de enfermedades es un paso esencial en el manejo integrado de las enfermedades de los cultivos agrícolas (Lin et al., 2010).

En los últimos años, principalmente durante los ciclos primavera-verano, se han observado plantas con

was to identify the race of *Fusarium oxysporum* causing wilt, vascular necrosis and death of watermelon plants in Sonora, Mexico, by using specific primers and inoculation of the isolates into commercially available differential watermelon cultivars.

## Materials and methods

### Sample collection and isolation

Watermelon plants with symptoms of wilt and vascular necrosis (Figure 1A, 1B) were collected from an agricultural field located in the municipality of Hermosillo, Sonora, Mexico (29° 01' 39" NL and 111° 28' 02" WL). Stems from three symptomatic plants of the triploid Joy Ride (with partial resistance to race 1, and susceptible to Fon race 2 and 3) were washed with copious amounts of water, then internal ~1 cm sections of the stems were cut, superficially disinfected with 1% sodium hypochlorite for 1 min, rinsed three times with sterile distilled water, and placed on sterile blotting paper. Tissue fragments were seeded in PDA medium (Difco®) and incubated at 28 °C for 5 days. Pure cultures of the isolates were obtained from a single spore. For morphological identification, tissue mounts from 10-day-old cultures were made. Three representative isolates (one isolate per plant) named UESFON01, UESFON02 and UESFON03 were inoculated into watermelon plants, with one true leaf, of the cultivar Sugar Baby, which is considered universally susceptible, since it lacks resistance genes to all known *Fon* races.

Inoculation was performed on 15 watermelon seedlings per isolate, by pipetting 5 mL of a conidial suspension ( $1 \times 10^6$  spores·mL<sup>-1</sup>) into the substrate around the plant. Control plants were only treated with sterile water (Latin & Snell, 1986). After the treatments, plants were kept in a growth chamber at  $30 \pm 2$  °C.

### Molecular identification of races of *F. oxysporum* f. sp. *niveum*

The 3% CTAB method (Zhang, Uyemoto, & Kirkpatrick, 1998), with some modifications, was used for DNA extraction. A piece of mycelium was obtained from each of the three monoconidial fungal isolates, transferred to a 1.5 mL tube and macerated with 800 µL of 3% CTAB extraction buffer, then incubated at 60 °C for 30 min. Samples were extracted with chloroform-isoamyl alcohol (24:1), 15 µL RNase A (1 µg·µL<sup>-1</sup>) was added and then the samples were incubated at 37 °C for 10 min. The aqueous DNA layer was precipitated with 600 µL of isopropanol at -20 °C. The DNA pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature, then resuspended in 30 µL of nuclease-free water (Invitrogen) and stored at -20 °C for further analysis. DNA quality and integrity were

síntomas similares a los descritos por *F. oxysporum* en plantaciones comerciales de sandías en Hermosillo, Sonora, México. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar la raza de *Fusarium oxysporum* causante de la marchitez, necrosis vascular y muerte de plantas de sandías en Sonora, México, mediante el uso de primers específicos y la inoculación de los aislados en cultivares diferenciales de sandía disponibles comercialmente.

## Materiales y métodos

### Colecta de muestras y aislamiento

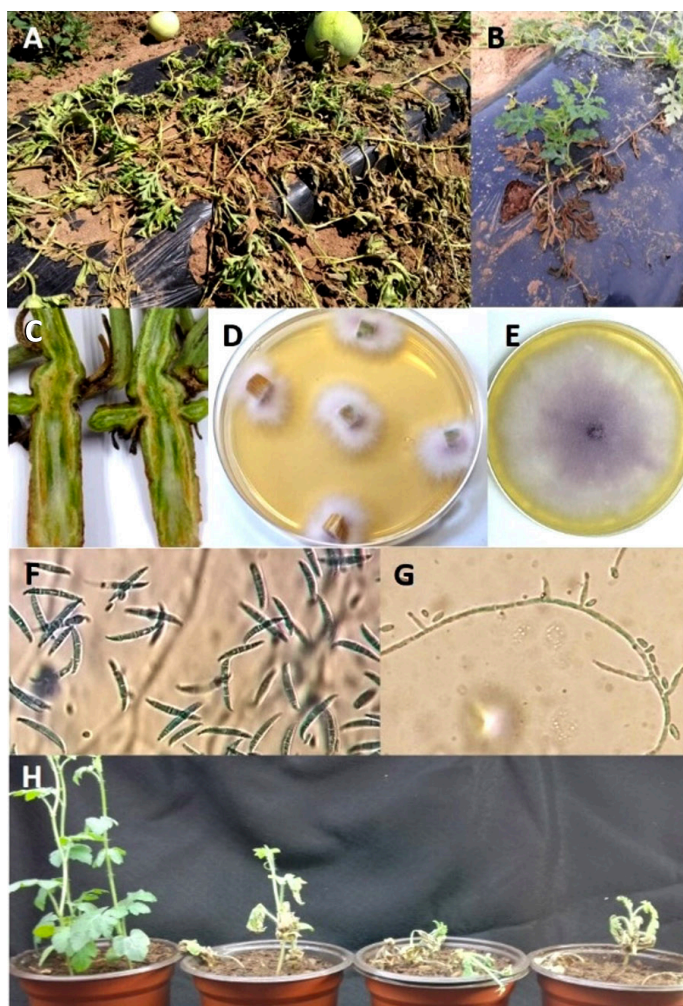
Se colectaron plantas de sandía con síntomas de marchitez y necrosis vascular (Figura 1A, 1B) en un campo agrícola ubicado en el municipio de Hermosillo, Sonora, México (29° 01' 39" LN y 111° 28' 02" LO). Se lavaron con abundante agua tallos de tres plantas sintomáticas del triploide Joy Ride (con resistencia parcial a la raza 1, y susceptible a las razas 2 y 3 de *Fon*), se cortaron secciones internas de los tallos de ~1 cm, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se colocaron en papel secante esterilizado. Los fragmentos de tejido se sembraron en medio PDA (Difco®) e incubaron a 28 °C durante 5 días. Se obtuvieron cultivos puros de los aislamientos a partir de una sola espora. Para la identificación morfológica, se realizaron montajes de tejido de cultivos de 10 días de edad. Se inocularon tres aislados representativos (un aislado por planta), denominados UESFON01, UESFON02 y UESFON03, en plantas de sandía, con una hoja verdadera, del cultivar Sugar Baby, el cual es considerado como un susceptible universal, pues carece de genes de resistencia a todas las razas conocidas de *Fon*.

La inoculación se realizó en 15 plántulas de sandía por aislamiento, con el pipeteo de 5 mL de una suspensión conidial ( $1 \times 10^6$  esporas·mL<sup>-1</sup>) en el sustrato alrededor de la planta. Las plantas control sólo se trataron con agua esterilizada (Latin & Snell, 1986). Después de los tratamientos, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a  $30 \pm 2$  °C.

### Identificación molecular de razas de *F. oxysporum* f. sp. *niveum*

Para la extracción del ADN se empleó el método de CTAB al 3% (Zhang, Uyemoto, & Kirkpatrick, 1998), con algunas modificaciones. Se obtuvo un trozo de micelio de cada uno de los tres aislados fúngicos monoconidiales, el cual se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se maceró con 800 µL de buffer de extracción CTAB al 3%; posteriormente, se incubó a 60 °C durante 30 min. Las muestras se extrajeron con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1),





**Figure 1.** Symptoms and morphology of *F. o* f. sp. *niveum* isolated from watermelon plants with symptoms of wilt and vascular necrosis: A) wilt under field conditions, B) wilt on one side of the plant only, C) vascular necrosis on stem, D) isolation on PDA medium, 72 h after incubation (ai), E) growth on PDA at 8 days ai, F) macroconidia, G) short phialides and H) pathogenicity tests (from left to right: control, isolates UESFON01, UESFON02 and UESFON03).

**Figura 1.** Síntomas y morfología de *F. o* f. sp. *niveum* aislado de plantas de sandías con síntomas de marchitez y necrosis vascular: A) marchitez en condiciones de campo, B) marchitez de un solo lado de la planta, C) necrosis vascular en tallo, D) aislamiento en medio PDA, 72 h después de incubación (di), E) crecimiento en PDA a los 8 días di, F) macroconidias, G) fíalides cortas y H) pruebas de patogenicidad (de izquierda a derecha: control, aislamiento UESFON01, UESFON02 y UESFON03).

assessed by electrophoresis on 1% agarose gels and by spectrophotometry (A260/A280) with a Nanodrop (ND-1000-UV-Vis, Nanodrop Technologies, USA).

DNA extracted from the fungal isolates was analyzed by PCR with three different primer pairs, which allow differentiating *Fon* races 1, 2 and 3 (Table 1). The first *Fon*-1/*Fon*-2 primer pair, specific for *Fon*, amplifies a 174 bp region (Lin et al., 2010). The second *FONSIX6F*/*FONSIX6R* pair amplifies a 453 bp fragment and allows differentiating *Fon* race 2 isolates from race 1 and 3 isolates, based on the absence of the *SIX6* gene (Niu et al., 2016). Finally, *FNR3-F* and *FNR3-R* amplify

se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de RNasa A ( $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 min. La capa acuosa de ADN se precipitó con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol a  $-20^\circ\text{C}$ . La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70 % y se secó a temperatura ambiente, para después resuspenderla en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Invitrogen) y almacenarla a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. La calidad e integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % y por espectrofotometría (A260/A280) con un Nanodrop (ND-1000-UV-Vis, Nanodrop Technologies, EUA).

El ADN extraído de los aislados fúngicos se analizó por PCR con tres diferentes pares de primers, los cuales

**Table 1. Characteristics of the oligonucleotides used in this study.****Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos empleados en el presente estudio.**

Name/ Nombre	Primer (5' - 3')	Size (bp)/ Tamaño (bp)	Specificity*/ Especificidad*	Reference/ Referencia
Fon-1 Fon-2	CGATTAGCGAAGACATTACACAAGACT ACGGTCAAGAAGATGCAGGGTAAAGGT	174	Fon	Lin et al. (2010)
FONSIX6F FONSIX6R	CGCTCTTATCGCATCAATCT GGGTTGACTGAGGTCGTGGT	453	Fon2	Niu et al. (2016)
FNR3-F FNR3-R	CGGCTTTCCTCTGTGATAGT TAGTGAGGTCCATGCCACGAA	511	Fon3	Hudson et al. (2021)

\*Fon = *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; Fon2 = Fon race 2; Fon3 = Fon race 3.

\*Fon = *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; Fon2 = raza 2 de Fon; Fon3 = raza 3 de Fon.

511 bp and allow differentiating *Fon* race 3 isolates from race 1 and 2 isolates (Hudson et al., 2021). PCR reaction mixtures were performed in a 25  $\mu$ L volume, which contained 1  $\mu$ L of DNA, 1X of buffer, 2 mM of  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ M of each primer pair, 0.2 mM of each triphosphate nucleotide (dNTP) and 1 unit of Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil). Reactions were carried out in an automatic thermal cycler (C1000 Thermal Cycler, BioRad, USA).

The amplification conditions are described below. The Fon-1/Fon-2 primers had an initial denaturation at 94 °C for 90 s, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s, with a final extension of 72 °C for 10 min. The FONSIX6F/FONSIX6R primers had one cycle amplification at 95 °C for 3 min, 30 successive cycles of 94 °C for 1 min, 66 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension cycle at 72 °C for 10 min (Branham, Levi, & Wechter, 2019). The FNR3-F/FNR3-R primers underwent initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 63 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, with a final elongation at 72 °C for 6 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels stained with ethidium bromide (2 mg· $\mu$ L<sup>-1</sup>) and visualized in a UV transilluminator (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad, USA). Amplicons from the Fon-1/Fon-2 primers were purified and sequenced in both directions using the respective primer pair separately. For sequencing, an automated sequencer (3500 and 3130 Series Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, USA) was used.

### Inoculation in differential watermelon plants

The three *Fon* isolates were inoculated into the differential watermelon cultivars Sugar Baby (without resistance genes to *Fon* 0, 1, 2 and 3), Charleston Gray (resistant to *Fon* 0, susceptible to *Fon* 1, 2 and 3) and Dixielee (resistant to *Fon* 0 and 1, susceptible to *Fon* 2 and 3), in order to avoid confusing race 0 with race 1.

permiten diferenciar las razas 1, 2 y 3 de *Fon* (Cuadro 1). El primer par de primers Fon-1/Fon-2, específicos para *Fon*, amplifican una región de 174 pb (Lin et al., 2010). El segundo par, FONSIX6F/FONSIX6R, amplifica un fragmento de 453 pb y permite diferenciar *Fon* raza 2, de aislados de raza 1 y 3, con base en la ausencia del gen *SIX6* (Niu et al., 2016). Finalmente, FNR3-F y FNR3-R amplifican 511 pb y permiten diferenciar aislados de *Fon* raza 3, de aislados de raza 1 y 2 (Hudson et al., 2021). Las mezclas de reacción de PCR se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ L, el cual contenía 1  $\mu$ L de ADN, 1X de buffer, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0.2  $\mu$ M de cada par de primers, 0.2 mM de cada nucleótido trifosfatado (dNTP) y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologie, Brasil). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automático (C1000 Thermal Cycler, BioRad, EUA).

Las condiciones de amplificación se describen a continuación. Los primers Fon-1/Fon-2 tuvieron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 90 s, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, con una extensión final de 72 °C por 10 min. Los primers FONSIX6F/FONSIX6R tuvieron una amplificación de un ciclo a 95 °C por 3 min, 30 ciclos sucesivos de 94 °C por 1 min, 66 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min (Branham, Levi, & Wechter, 2019). Los primers FNR3-F/FNR3-R tuvieron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 63 °C durante 30 s y 72 °C durante 40 s, con una elongación final a 72 °C durante 6 min. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (2 mg· $\mu$ L<sup>-1</sup>), y se visualizaron en un transiluminador UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad, EUA). Los amplicones de los primers Fon-1/Fon-2 se purificaron y se secuenciaron en ambas direcciones, usando el respectivo par de iniciadores por separado. Para la secuenciación, se utilizó un secuenciador automatizado (3500 y 3130 Series Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, EUA).

For this, seeds of the three differential cultivars were sown in sterilized Peat Moss, in germination trays with 50 cavities with a volume of 62.5 cm<sup>3</sup> per cavity. After 15 days, 30 plants with a true leaf were inoculated into the substrate around the plant with 5 mL of a conidial suspension ( $1 \times 10^6$  spores·mL<sup>-1</sup>). Control plants were only treated with sterile water (Latin & Snell, 1986; Pal, Rao, Thontadarya, Chandran, & Sriram, 2020). Spores of each fungal isolate were obtained by adding 30 mL of sterile distilled water to PDA dishes with the fungus grown for 10 days. The mycelium was scraped superficially and filtered through sterile gauze to remove mycelial fragments and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  spores·mL<sup>-1</sup>. The assay was performed twice under similar experimental conditions.

Watermelon cultivars were considered susceptible if they showed  $\geq 33$  % of plants with wilt symptoms or death, and resistant if they had  $< 33$  % wilted or dead plants after inoculation with the fungus (Zhou, Everts, & Bruton, 2010; Pal et al., 2020). Inoculated watermelon plants were evaluated individually in order to observe typical *Fon* symptoms (chlorosis, wilt, or plant death) up to 28 days after inoculation.

## Results and discussion

### Isolation and morphological identification

Only *Fusarium oxysporum* was isolated from watermelon plants with symptoms of wilt and vascular necrosis. Plants collected in the field showed chlorosis, generalized wilting (Figure 1A) or wilting on only one side of the plant (Figure 1B). Also, necrosis and discoloration of the vascular tissue of the stem was observed, which can be easily distinguished with a longitudinal or transversal cut in the lower part of the stem (Figure 1C). Three representative isolates of *Fusarium oxysporum* (with identification keys UESFON01, UESFON02 and UESFON03) from different symptomatic plants were selected for identification at race level.

*Fusarium* isolates showed the following morphological characteristics: pink to purple mycelium (Figures 1D and 1E), macroconidia curved and pointed at the ends with three to five cells from 18.76 to 41.9  $\mu\text{m}$  long and 3.38 to 4.34  $\mu\text{m}$  wide (Figure 1F), oval to ellipsoid-shaped unicellular microconidia from 6.1 to 12.8  $\mu\text{m}$  long and 2.12 to 3.4  $\mu\text{m}$  wide, and short monophialides (Figure 1G). Based on these morphological characteristics, isolates UESFON01, UESFON02 and UESFON03 were identified as *Fusarium oxysporum* (Leslie & Summerell, 2006). Likewise, all three isolates caused symptoms of chlorosis, wilt, and death when inoculated into watermelon cultivar Sugar Baby seedlings (Figure 1H).

### Inoculación en plantas diferenciales de sandía

Los tres aislados de *Fon* se inocularon en los cultivares diferenciales de sandía Sugar Baby (sin genes de resistencia a *Fon* 0, 1, 2 y 3), Charleston Gray (resistente a *Fon* 0, susceptible a *Fon* 1, 2 y 3) y Dixielee (resistente a *Fon* 0 y 1, susceptible a *Fon* 2 y 3), con la finalidad de evitar confundir la raza 0 con la raza 1. Para esto, se sembraron semillas de los tres cultivares diferenciales en Peat Moss esterilizado, en charolas germinadoras de 50 cavidades con un volumen de 62.5 cm<sup>3</sup> por cavidad. Después de 15 días, se inocularon 30 plantas, con una hoja verdadera, en el sustrato alrededor de la planta con 5 mL de una suspensión conidial ( $1 \times 10^6$  esporas·mL<sup>-1</sup>). Las plantas control sólo se trataron con agua esterilizada (Latin & Snell, 1986; Pal, Rao, Thontadarya, Chandran, & Sriram, 2020). Las esporas de cada aislado fúngico se obtuvieron al adicionar 30 mL de agua destilada esterilizada a cajas con PDA con el hongo crecido durante 10 días. El micelio se raspó superficialmente y se filtró a través de gasas estériles para remover los fragmentos de micelio y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas·mL<sup>-1</sup>. El ensayo se realizó dos veces bajo condiciones experimentales similares.

Los cultivares de sandía se consideraron susceptibles si mostraban  $\geq 33$  % de plantas con síntomas de marchitez o muerte, y resistentes si tuvieron  $< 33$  % de plantas marchitas o muertas después de la inoculación con el hongo (Zhou, Everts, & Bruton, 2010; Pal et al., 2020). Las plantas de sandía inoculadas se evaluaron de manera individual con la finalidad de observar los síntomas típicos de *Fon* (clorosis, marchitez o muerte de plantas) hasta los 28 días después de la inoculación.

## Resultados y discusión

### Aislamiento e identificación morfológica

Se aisló únicamente a *Fusarium oxysporum* a partir de plantas de sandía con síntomas de marchitez y necrosis vascular. Las plantas colectadas en campo presentaron clorosis, marchitez generalizada (Figura 1A) o marchitamiento de un solo lado de la planta (Figura 1B). También, se observó necrosis y decoloración del tejido vascular del tallo, la cual se puede distinguir fácilmente con un corte longitudinal o transversal en la parte baja del tallo (Figura 1C). Se seleccionaron tres aislados representativos de *Fusarium oxysporum* (con claves de identificación UESFON01, UESFON02 y UESFON03) de diferentes plantas sintomáticas para su identificación a nivel de raza.

Los aislados de *Fusarium* presentaron las siguientes características morfológicas: micelio de color rosado a púrpura (Figuras 1D y 1E), macroconidios curvados y puntiagudos en los extremos con tres a cinco células



*Fusarium oxysporum* is a complex of isolates capable of causing disease in a wide range of agriculturally important crops. *F. oxysporum* is characterized by a high degree of host specificity. Isolates that are pathogenic to a single host are grouped in a special form (Rana, Sahgal, & Johri, 2017). *F. o. f. sp. niveum* is the special form that is pathogenic to watermelon; however, there are more than 100 recognized special forms, and identification based on their spore morphology is not possible due to the great similarity between special forms and other *Fusarium* species. Therefore, molecular identification is an important alternative for a more accurate identification, as it has advantages over traditional diagnostic methods, since it is faster, more sensitive and more reliable (Lin et al., 2010; Martyn, 2014; Hudson et al., 2021).

### Molecular identification with specific primers

PCR with the specific primers Fon-1/Fon-2 amplified a 174 bp fragment, which confirmed that isolates UESFON01, UESFON02 and UESFON03 belong to the special *niveum* form (Figure 2A). Likewise, amplification of 453 and 511 bp fragments was observed with primers FONSIX6F/FONSIX6R and FNR3-F/FNR3-R, respectively (Figure 2B and 2C).

The sequences of the amplicons obtained with the Fon-1/Fon-2 primers (OP060462, OP060463, OP060464) from the DNA of isolates UESFON01, UESFON02, and UESFON03 were deposited in the National Center for Biotechnology Information's GenBank (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). These sequences were compared using NCBI's BLAST program and showed 98 to 100 % similarity to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (EU603504.1).

During infection in the host plant, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* secretes effector proteins into the xylem that can promote virulence or trigger resistance. SIX6 (secreted in xylem protein 6) is an avirulence

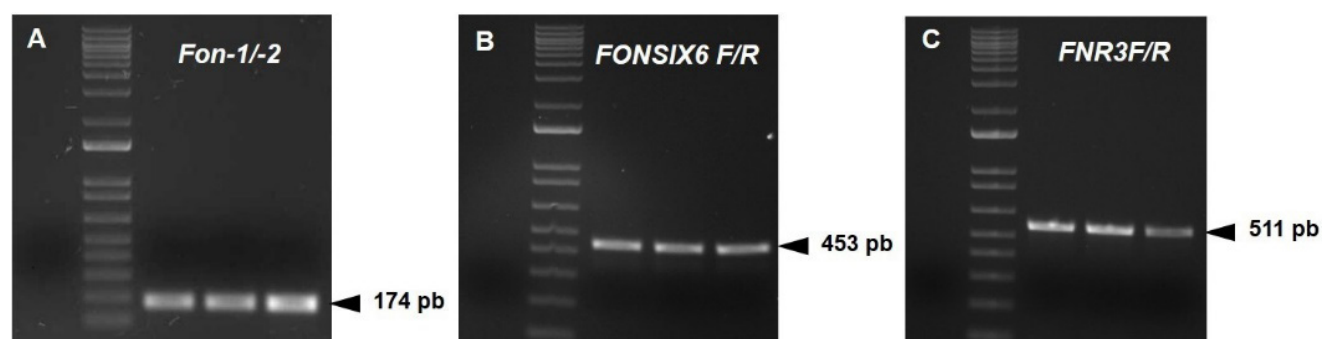
de 18.76 a 41.9  $\mu\text{m}$  de largo y 3.38 a 4.34  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1F), microconidios unicelulares de forma oval o elipsoidal de 6.1 a 12.8  $\mu\text{m}$  de largo y 2.12 a 3.4  $\mu\text{m}$  de ancho, y monofiálides cortas (Figura 1G). De acuerdo con estas características morfológicas, los aislados UESFON01, UESFON02 y UESFON03 se identificaron como *Fusarium oxysporum* (Leslie & Summerell, 2006). Asimismo, los tres aislados causaron síntomas de clorosis, marchitez y muerte cuando se inocularon en plántulas de sandía cultivar Sugar Baby (Figura 1H).

*Fusarium oxysporum* es un complejo de aislados capaces de causar enfermedad en un amplio rango de cultivos de importancia agrícola. *F. oxysporum* se caracteriza por tener un alto grado de especificidad hacia un hospedante. Los aislados que son patogénicos a un solo hospedante se agrupan en una forma especial (Rana, Sahgal, & Johri, 2017). *F. o. f. sp. niveum* es la forma especial que es patogénica a la sandía; no obstante, existen más de 100 *formae speciales* reconocidas, y la identificación con base en la morfología de sus esporas no es posible debido a la gran similitud entre formas especiales y otras especies de *Fusarium*. Por ello, la identificación molecular es una alternativa importante para una identificación más exacta, pues presenta ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico, ya que es más rápida, sensible y confiable (Lin et al., 2010; Martyn, 2014; Hudson et al., 2021).

### Identificación molecular con primers específicos

La PCR con los primers específicos Fon-1/Fon-2 amplificaron un fragmento de 174 pb, lo cual permitió confirmar que los aislados UESFON01, UESFON02 y UESFON03 pertenecen a la forma especial *niveum* (Figura 2A). Asimismo, se observó la amplificación de fragmentos de 453 y 511 pb con los primers FONSIX6F/FONSIX6R y FNR3-F/FNR3-R, respectivamente (Figura 2B y 2C).

Las secuencias de los amplicones obtenidos con los primers Fon-1/Fon-2 (OP060462, OP060463, OP060464),



**Figure 2.** Amplification of *Fon* isolates with three primer pairs for identification of races 1, 2 and 3. A-C (from left to right): negative, molecular weight marker, UESFON01, UESFON02 and UESFON03.

**Figura 2.** Amplificación de aislados de *Fon* con tres pares de primers para la identificación de las razas 1, 2 y 3. A-C (de izquierda a derecha): negativo, marcador de peso molecular, UESFON01, UESFON02 y UESFON03.

gene that is present in races 0, 1 and 3, but not in race 2 (Niu et al., 2016). On the other hand, Hudson et al. (2021) performed a genomic analysis of *Fon* races 1, 2 and 3, and designed the FNR3-F/FNR3-R markers that amplify a 511 bp region, within a larger region (1,121 bp), on the pathogenicity chromosome that is absent in race 3, and present in races 1 and 2, making it possible to differentiate race 3 from races 1 and 2. Therefore, Hudson et al. (2021) point out that only race 1 isolates amplify with all three primer pairs, while the identification of *Fon* races 2 and 3 is determined by the absence of amplification when using the corresponding primer pair.

Based on the above, isolates UESFON01, UESFON02 and UESFON03 were identified as belonging to race 1. However, with these primers it is not possible to identify or determine race 0, since when race 0 isolates are amplified with these primers the results are variable (Keinath, DuBose, Katawczik, & Wechter, 2020; Hudson et al., 2021). Therefore, to avoid confusing the isolates with those of race 0, it is necessary to inoculate these into commercially available differential watermelon cultivars, which allow differentiating between *Fon* races 0 and 1 (Kleczewski & Egel, 2011; Zhou & Everts, 2003).

### Inoculation into differential plants

The reaction to the disease (susceptible or resistant) of the differential cultivars, when inoculated with the three *Fon* isolates, was the same in the two trials conducted; therefore, only data from the first trial are shown in Table 2. In this trial, Sugar Baby plants (universally susceptible) showed 100 % mortality, Charleston Gray plants (race 0 resistant, race 1 susceptible) showed mortality ranges between 73.4 and 86.7 %, and Dixilee plants (race 0 and 1 resistant) showed between 6.7 and 16.7 % dead plants with the inoculation of the isolates. The low percentage of wilt or mortality of Dixilee cultivar plants inoculated with UESFON01, UESFON02 and UESFON03 confirm that these isolates belong to *Fon* race 1.

Vascular wilt of watermelon was first observed in 1890 in the southern United States, and since then this disease has been reported on all continents (except Antarctica), being the most important fungal disease of this crop worldwide (Martyn, 2014). There are four *Fon* races: 0, 1, 2 and 3 (Rahman et al., 2021), which are present in the United States and some other countries; however, in Mexico there is no information on the presence, distribution or prevalence of these races in the different watermelon-producing areas. There are many diploid watermelon cultivars with resistance to race 0 and race 1 isolates; however, increased production of triploid (seedless) watermelons, many of which lack high levels of resistance to race 1, has allowed a resurgence of *Fusarium* wilt (Everts, Egel,

a partir del ADN de los aislados UESFON01, UESFON02 y UESFON03, se depositaron en el Banco de Genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas secuencias se compararon mediante el programa BLAST del NCBI, y mostraron de 98 a 100 % de similitud con *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (EU603504.1).

Durante la infección en la planta huésped, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* secreta proteínas efectoras en el xilema que pueden favorecer la virulencia o desencadenar resistencia. *SIX6* (proteína secretada en el xilema) es un gen de avirulencia que está presente en las razas 0, 1 y 3, pero no en la raza 2 (Niu et al., 2016). Por otra parte, Hudson et al. (2021) realizaron un análisis genómico de las razas 1, 2 y 3 de *Fon*, y diseñaron los marcadores FNR3-F/FNR3-R que amplifican una región de 511 pb, dentro de una región más grande (1,121 pb), en el cromosoma de patogenicidad que está ausente en la raza 3, y presente en las razas 1 y 2, con lo cual es posible diferenciar la raza 3 de las razas 1 y 2. Por lo anterior, Hudson et al. (2021) señalan que sólo los aislados de la raza 1 amplifican con los tres pares de primers, mientras que la identificación de las razas 2 y 3 de *Fon* se determina por la ausencia de la amplificación al usar el correspondiente par de primers.

Con base en lo anterior, los aislados UESFON01, UESFON02 y UESFON03 se identificaron como pertenecientes a la raza 1. Sin embargo, con estos primers no es posible identificar o determinar la raza 0, ya que cuando se amplifican aislamientos de la raza 0 con estos primers los resultados son variables (Keinath, DuBose, Katawczik, & Wechter, 2020; Hudson et al., 2021). Por lo tanto, para evitar confundir los aislados con los de la raza 0, es necesario inocular éstos en cultivares diferenciales de sandía disponibles comercialmente, que permiten diferenciar entre la raza 0 y 1 de *Fon* (Kleczewski & Egel, 2011; Zhou & Everts, 2003).

### Inoculación en plantas diferenciales

La reacción a la enfermedad (susceptible o resistente) de los cultivares diferenciales, cuando se inocularon con los tres aislados de *Fon*, fue igual en los dos ensayos realizados; por ello, en el Cuadro 2 sólo se muestran los datos del primero. En este ensayo, las plantas de Sugar Baby (susceptible universal) mostraron 100 % de mortalidad, Charleston Gray (resistente a la raza 0, susceptible a la raza 1) presentó rangos de mortalidad entre 73.4 y 86.7 %, mientras que, Dixilee (resistente a la raza 0 y 1) mostró entre 6.7 y 16.7 % de plantas muertas con la inoculación de los aislamientos. El bajo porcentaje de marchitez o mortalidad de plantas del cultivar Dixilee inoculadas con UESFON01, UESFON02 y UESFON03 confirman que estos aislados pertenecen a la raza 1 de *Fon*.



**Table 2. Reaction of differential plants to inoculation with three isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 28 days after inoculation.****Cuadro 2. Reacción de plantas diferenciales a la inoculación con tres aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 28 días después de la inoculación.**

Isolate/Differential/ Aislado/Diferencial	Number of inoculated plants/ Número de plantas inoculadas	Mortality (%)/ Mortalidad (%)	Reaction to the disease/ Reacción a la enfermedad
UESFON01			
Sugar Baby	30	100	S
Charleston Gray	30	76.7	S
Dixilee	30	16.7	R
-----			
UESFON02			
Sugar Baby	30	100	S
Charleston Gray	30	86.7	S
Dixilee	30	6.7	R
-----			
UESFON03			
Sugar Baby	30	100	S
Charleston Gray	30	73.4	S
Dixilee	30	13.3	R

Sugar Baby: universally susceptible; Charleston Gray: race 0 resistant; Dixilee: race 1 resistant. S = susceptible; R = resistant.

Sugar Baby: susceptible universal; Charleston Gray: resistente a la raza 0; Dixilee: resistente a la raza 1. S = susceptible; R = resistente.

Langston, & Zhou, 2014; Everts & Himmelstein, 2015). For race 2, there are no cultivars with resistance to *Fusarium*, except PI296341- FR (Martyn & Netzer, 1991), while race 3, first reported in Maryland, is highly virulent to all watermelon cultivars, including PI296341- FR (Zhou et al., 2010).

*Fon* race 0 is of little economic importance because most cultivated cultivars are resistant to it (Everts & Himmelstein, 2015), whereas *Fon* race 1 is considered the most dominant race in watermelon-producing areas of the world (Rahman et al., 2021), such as India (Pal et al., 2020), Turkey (Kurt et al., 2008) and China (Zhong et al., 2022). However, race 2 is currently an emerging problem and has been reported to be more prevalent than race 1 in several regions (Zhou & Everts, 2003; Keinath et al., 2020), such as Israel (Netzer, 1976), Spain (Gonzalez-Torres, Meléro-Vara, Gómez-Vázquez, & Jiménez-Díaz, 1993) and China (Duan et al., 2007). The increase in race 2 populations is favored by the use of cultivars with resistance to races 0 and 1 (Hopkins, Lobinske, & Larkin, 1992; Zhou & Everts, 2007).

In Mexico, despite the great importance of watermelon cultivation, there is no information on the *Fon* races associated with wilt or plant death in watermelon cultivation. In this study, based on the symptoms described, morphological characteristics, amplification with the specific primers Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R and FNR3-F/FNR3-R, and inoculation of three differential watermelon cultivars, it can be concluded that race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* is part

La marchitez vascular de la sandía se observó por primera vez en 1890 al sur de Estados Unidos, y desde entonces esta enfermedad ha sido reportada en todos los continentes (excepto en la Antártida), siendo la enfermedad fúngica más importante de este cultivo a nivel mundial (Martyn, 2014). Existen cuatro razas de *Fon*: 0, 1, 2 y 3 (Rahman et al., 2021), las cuales están presentes en Estados Unidos y en algunos otros países; sin embargo, en México no hay información sobre la presencia, la distribución o prevalencia de estas razas en las diferentes zonas productoras de sandía. Existen muchos cultivares de sandías diploides con resistencia a los aislados de las razas 0 y 1; no obstante, el incremento en la producción de sandías triploides (sin semillas), muchas de las cuales carecen de altos niveles de resistencia a la raza 1, ha permitido el resurgimiento de la marchitez por *Fusarium* (Everts, Egel, Langston, & Zhou, 2014; Everts & Himmelstein, 2015). Para la raza 2, no hay cultivares con resistencia a *Fusarium*, excepto PI296341- FR (Martyn & Netzer, 1991). Mientras que la raza 3, reportada por primera vez en Maryland, es altamente virulenta a todos los cultivares de sandía, incluyendo al PI296341- FR (Zhou et al., 2010).

La raza 0 de *Fon* tiene poca importancia económica debido a que la mayoría de los cultivares que se cultivan son resistentes a ésta (Everts & Himmelstein, 2015). Mientras que, la raza 1 de *Fon* es considerada la más dominante en las áreas productoras de sandías del mundo (Rahman et al., 2021), como la India (Pal et al., 2020), Turquía (Kurt et al., 2008) y China (Zhong et al., 2022). No obstante, la raza 2 es, actualmente, un problema emergente y ha sido

of the fungal complex that causes wilt and death of watermelon plants in Mexico.

## Conclusion

*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 1 was identified as a causal agent of wilt and plant death in the watermelon crop in Hermosillo, Sonora, Mexico. This is the first report of *Fon* race 1 in watermelon in our country, and it will help to better understand the fungal diseases that threaten this crop. Likewise, it will allow the development of integrated control strategies to improve the production of this crop.

### End of English version

## References / Referencias

- Branham, S. E., Levi, A., & Wechter, W. P. (2019). QTL mapping identifies novel source of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in *Citrullus amarus*. *Plant disease*, 103(5), 984-989. doi: 10.1094/PDIS-09-18-1677-RE
- Callaghan, S. E., Puno, V. I., Williams, A. P., Weir, B. S., Balmas, V., Sengsoulichan, K.,... Burgess, L. W. (2016). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in the Lao PDR. *Australasian Plant Disease Notes*, 11(9), 1-5. doi: 10.1007/s13314-016-0191-8
- Dau, V. T., Burgess, L. W., Pham, L. T., Phan, H. T., Nguyen, H. D., Le, T. V., & Nguyen, D. H. (2009). First report of *Fusarium* wilt of watermelon in Vietnam. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 1-3. doi: 10.1071/DN09001
- Duan, H. J., Zhang, C. Y., Li, X. H., Guo, X. M., Wang, X. F., & Ma, Z. Y. (2007). Identification of physiological races and AFLP analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* from Hebei province. *Scientia Agricultura Sinica*, 40(5), 925-931. Retrieved from [https://www.chinaagrisci.com/EN/volumn/volumn\\_1899.shtml](https://www.chinaagrisci.com/EN/volumn/volumn_1899.shtml)
- Everts, K. L., Egel, D. S., Langston, D., & Zhou, X. G. (2014). Chemical management of *Fusarium* wilt of watermelon. *Crop Protection*, 66, 114-119. doi: 10.1016/j.cropro.2014.09.003
- Everts, K. L., & Himmelstein, J. C. (2015). *Fusarium* wilt of watermelon: towards sustainable management of a re-emerging plant disease. *Crop Protection*, 73, 93-99. doi: 10.1016/j.cropro.2015.02.019
- Fernández-Herrera, E., González-Soto, T. E., & Ramírez-Bustos, I. I. (2021). *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*: causal agent of vascular wilt of watermelon. *Agroproductividad*, 14(5), 57-63. doi: 10.32854/agrop.v14i05.1924
- Gonzalez-Torres, R., Melero-Vara, J. M., Gómez-Vázquez, J., & Jiménez-Díaz, R. M. (1993). The effects of soil solarization and soil fumigation on *Fusarium* wilt of watermelon grown in plastic houses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*, 42, 858-864. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb02671.x
- reportada con mayor prevalencia que la raza 1 en varias regiones (Zhou & Everts, 2003; Keinath et al., 2020), como Israel (Netzer, 1976), España (Gonzalez-Torres, Melero-Vara, Gómez-Vázquez, & Jiménez-Díaz, 1993) y China (Duan et al., 2007). El incremento en las poblaciones de la raza 2 es favorecido por el uso de cultivares con resistencia a las razas 0 y 1 (Hopkins, Lobinske, & Larkin, 1992; Zhou & Everts, 2007).
- En México, a pesar de la gran importancia que tiene el cultivo de la sandía, no hay información sobre las razas de *Fon* asociadas con la marchitez o muerte de plantas en el cultivo de sandía. En el presente estudio, basados en los síntomas descritos, las características morfológicas, la amplificación con los primers específicos Fon-1/Fon-2, FONSIX6F/FONSIX6R y FNR3-F/FNR3-R, y la inoculación en tres cultivares diferenciales de sandía, se puede concluir que la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* es parte del complejo de hongos que causan marchitez y muerte de plantas de sandía en México.

## Conclusión

Se identificó a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* raza 1 como agente causal de marchitez y muerte de plantas en el cultivo de sandía en Hermosillo, Sonora, México. Este es el primer reporte de *Fon* raza 1 en el cultivo de sandía en nuestro país, y ayudará a comprender mejor las enfermedades fúngicas que amenazan al cultivo de la sandía. Asimismo, permitirá desarrollar estrategias de control integrado para mejorar la producción de este cultivo.

### Fin de la versión en español

- Hopkins, D. L., Lobinske, R. J., & Larkin, R. P. (1992). Selection for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 in monocultures of watermelon cultivars resistant to *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 82, 290-293. doi: 10.1094/Phyto-82-290
- Hudson, O., Waliullah, S., Fulton, J. C., Ji, P., Dufault, N. S., Keinath, A., & Ali, M. E. (2021). Marker development for differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 3 from races 1 and 2. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 822. doi: 10.3390/ijms22020822
- Kang, S., Demers, J., Jimenez-Gasco, M. M., & Rep, M. (2014). *Fusarium oxysporum*. In: Dean, R. A., Lichens-Park, A., & Kole, C. (Eds.), *Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: dicot pathogens* (pp. 99-119). USA: Springer. doi: 10.1007/978-3-662-44056-8
- Keinath, A. P., DuBose, V. B., Katawczik, M. M., & Wechter, W. P. (2020). Identifying races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in South Carolina recovered from watermelon seedlings, plants, and field soil. *Plant Disease*, 104(9), 2481-2488. doi: 10.1094/PDIS-11-19-2385-RE

- Kleczewski, N. M., & Egel, D. S. (2011). A diagnostic guide for Fusarium wilt of watermelon. Online. *Plant Health Progress*, 12(1), 1-10. doi: 10.1094/PHP-2011-1129-01-DG
- Kurt, S., Dervis, S., Soyulu, E. M., Tok, F. M., Yetisir, H., & Soyulu, S. (2008). Pathogenic races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in Southern Turkey. *Phytoparasitica*, 36(2), 107-116. doi: 10.1007/BF02981324
- Latin, R. X., & Snell, S. J. (1986). Comparison of methods for inoculation of muskmelon with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Plant Disease*, 70, 297-300. doi: 10.1094/PD-70-297
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA: Blackwell Publishing, Ames. doi: 10.1002/9780470278376
- Lin, Y. H., Chen, K. S., Chang, J. Y., Wan, Y. L., Hsu, C. C., Huang, J. W., & Chang, P. F. (2010). Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology*, 27(4), 409-418. doi: 10.1016/j.nbt.2010.05.005
- Martyn, R. D. (2014). Fusarium wilt of watermelon: 120 years of research. *Horticultural Reviews*, 42, 349-442. doi: 10.1002/9781118916827.ch07
- Martyn, R. D., & Netzer, D. (1991). Resistance to races 0, 1 and 2 of *Fusarium* wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341- FR. *HortScience*, 26(4), 429-432. doi: 10.21273/HORTSCI.26.4.429
- Netzer, D. (1976). Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytoparasitica*, 4(2), 131-136. doi: 10.1007/BF02980343
- Niu, X., Zhao, X., Ling, K. S., Levi, A., Sun, Y., & Fan, M. (2016). The *FonSIX6* gene acts as an avirulence effector in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* -watermelon pathosystem. *Scientific Reports*, 6(1), 1-7. doi: 10.1038/srep28146
- Pal, S., Rao, E. S., Thontadarya, R. N., Chandran, N. K., & Sriram, S. (2020). First report on the occurrence of races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* infecting watermelon in India. *Indian Phytopathology*, 73, 793-796. doi: 10.1007/s42360-020-00270-7
- Petkar, A., & Ji, P. (2017). Infection courts in watermelon plants leading to seed infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology*, 107(7), 828-833. doi: 10.1094/PHYTO-12-16-0429-R
- Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant-host interaction. In: Satyanarayana, T., Deshmukh, S. K., & Johri, B. N. (Eds), *Developments in fungal biology and applied mycology* (pp. 159-199). New Delhi, India: Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-4768-8
- Rahman, M. Z., Ahmad, K., Kutawa, A. B., Siddiqui, Y., Saad, N., Hun, T. G.,... Hossain, M. I. (2021). Biology, diversity, detection and management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing vascular wilt disease of watermelon (*Citrullus lanatus*): a review. *Agronomy*, 11, 1310. doi: 10.3390/agronomy11071310
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). *Panorama Agroalimentario*. Retrieved from [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021)
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., & Kirkpatrick, B. C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71(1), 45-50. doi: 10.1016/S0166-0934(97)00190-0
- Zhong, X., Yang, Y., Zhao, J., Gong, B., Li, J., Wu, X., Gao, H., & Lu, G. (2022). Detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 1 in plants and soil by real-time PCR. *The Plant Pathology Journal*, 38(3), 229-238. doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2022.0039
- Zhou, X. G., & Everts, K. L. (2003). Races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in Maryland and Delaware. *Plant Disease*, 87, 692-698. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.6.692
- Zhou, X. G., & Everts, K. L. (2007). Characterization of a regional population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by race, cross pathogenicity, and vegetative compatibility. *Phytopathology*, 97(4), 461-469. doi: 10.1094/PHYTO-97-4-0461
- Zhou, X. G., Everts, K. L., & Bruton, B. D. (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. doi: 10.1094/PDIS-94-1-0092