

# Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México

## Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México

María Fernanda Ruiz-Cisneros, Claudio Rios-Velasco\*, David Ignacio Berlanga-Reyes, José de Jesús Ornelas-Paz, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Alejandro Romo-Chacón, Paul Baruk Zamudio-Flores, Daniel Alfonso Pérez-Corral, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Avenida Rio Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; Miguel Ángel Salas-Marina, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ingenierías, Unidad Académica Villacorzo. Km 3.0 Carretera Villacorzo-Ejido Monterrey. C.P. 29000, Villacorzo, Chiapas, México; Jorge Eugenio Ibarra-Rendón, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Campus Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Campus Posta Zootécnica, C.P. 58880, Michoacán, México. \*Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 20 de Abril, 2017.

Aceptado: 09 de Julio, 2017.

Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE, Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1704-3

Primera publicación DOI: 04 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 04, 2017.

**Resumen.** Se estimó la incidencia de enfermedades de raíz en manzanos de Chihuahua, México, y se identificaron trescientos aislados (hongos y Oomicetos) tomados del tejido de raíz y suelo de la rizosfera de árboles con síntomas de infección y

**Abstract.** The incidence of root diseases was estimated in apple orchards from Chihuahua, Mexico. Three hundred isolates (fungi and Oomycetes) were identified in samples of root tissue and soil of trees with infectious damage symptoms and disease symptom-free trees. At the same time, putatively antagonistic agents were isolated and subsequently identified. The pathogenicity of fifteen selected isolates (eight fungi and seven Oomycetes), was tested in twelve apple rootstocks under greenhouse conditions. In addition, the *in vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* and *Bacillus* species was evaluated against seven of the selected Oomycetes. The incidence of infection damage of roots in 20 tested orchards was 17% (1-40%). *Fusarium* was the most widely distributed fungi (67.8%). The distribution of the other organisms was variable.

libres de síntomas de enfermedad. Paralelamente, se aislaron e identificaron hongos putativamente antagonistas. Se determinó la patogenicidad de quince aislados seleccionados (ocho hongos y siete Oomicetos) sobre doce portainjertos de manzano bajo condiciones de invernadero. Adicionalmente, se evaluó la actividad antagónica *in vitro* de especies de *Trichoderma* y *Bacillus* contra siete de los Oomicetos seleccionados. La incidencia de daños infecciosos en raíz en 20 huertos analizados fue del 17% (1-40%). *Fusarium* fue el hongo más ampliamente distribuido (67.8%). La distribución del resto de los organismos fue variable. Se identificaron cuatro especies de *Trichoderma*, siendo *T. gamsii* la más ampliamente distribuida (72.5%). *Bacillus* spp., redujo sustancialmente el crecimiento radial (>90%,  $p=0.05$ ) de *Phytophthora cactorum*. Once portainjertos fueron susceptibles al menos a *Pythium ultimum* y *Phytophthora cactorum* C3. Los portainjertos G.935, Standard y M.25 fueron los más resistentes con 0% de incidencia. Las especies antagonistas de ambos géneros inhibieron *in vitro* significativamente el crecimiento de *P. cactorum* (86.4-93.8%,  $p=0.05$ ), respecto a especies de *Pythium*, por lo que podrían ser utilizados como agentes de control biológico.

**Palabras clave:** *Bacillus* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora cactorum*, *Trichoderma* spp., región ITS, identificación molecular

Los manzanos (*Malus x domestica* Borkh.) son uno de los cultivos templados más importantes en México (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2011). Los árboles de manzano son afectados por diversos factores bióticos y abióticos que limitan su producción, especialmente las enfermedades de raíz. En los agroecosistemas, el incremento en la diversidad de microorganismos patogénicos (Oomicetos, hongos,

Four species of *Trichoderma* were identified, with *T. gamsii* being the most widely distributed (72.5%). *Bacillus* spp. substantially reduced the radial growth (>90%,  $p=0.05$ ) of *Phytophthora cactorum*. Eleven rootstocks were susceptible to *Pythium ultimum* y *Phytophthora cactorum* C3. The G.935, Standard and M.25 rootstocks were the most resistant with 0% incidence. The antagonistic species of both genera inhibited the *in vitro* growth of *P. cactorum* (86.4-93.8%,  $p=0.05$ ), respect to *Pythium* species, and therefore, they might be used as biological control agents.

**Key words:** *Bacillus* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora cactorum*, *Trichoderma* spp., ITS region, molecular identification

Apples (*Malus x domestica* Borkh.) are one of the most important temperate crops in Mexico (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2011). Apple trees are affected by several biotic and abiotic factors that limit their production, especially root diseases. In agroecosystems, the increased diversity of pathogenic microorganisms (Oomycetes, fungi, bacteria, nematodes, among others) can lead to root rot diseases. The root diseases caused by fungi and Oomycetes in apple trees, represent one important economic problem worldwide. These microorganisms destroy and collapse the root system of susceptible rootstocks, reducing the absorption of nutrients and water, blocking vascular bundles and, eventually, causing the death of apple trees (Rumberger *et al.*, 2007; Samaniego-Gaxiola, 2007; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a, b). The main pathogens of apple trees include *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., among others (Latorre *et al.*, 2001; Samaniego-Gaxiola, 2007). However, there still are in many apple producing

bacterias, nematodos, entre otros), pueden conducir a las enfermedades de pudrición de raíz. Las enfermedades de raíz causadas por hongos y Oomicetos en árboles de manzano, representan un importante problema económico alrededor del mundo. Estos microorganismos destruyen y colapsan el sistema radicular de portainjertos susceptibles, reduciendo la absorción de agua y nutrientes, bloqueando los haces vasculares y eventualmente, causando la muerte de los árboles de manzano (Rumberger *et al.*, 2007; Samaniego-Gaxiola, 2007; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a, b). Los principales patógenos del manzano incluyen a *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., entre otros (Latorre *et al.*, 2001; Samaniego-Gaxiola, 2007). Sin embargo, en muchas áreas productoras de manzana, todavía hay patógenos que no han sido identificados como agentes de enfermedades para los manzanos. Las principales enfermedades en árboles de manzano, incluyen las enfermedades de pudrición de cuello y corona, resultado de un complejo de patógenos (Lamichhane y Venturi, 2015). La incidencia, agentes causales y patogenicidad de agentes causales de enfermedades de pudrición de cuello y raíz, han sido pobremente estudiados durante las últimas tres décadas en huertos de manzano del norte de México. Se requiere información en este sentido, en particular en ésta área productora de manzana, para desarrollar un mejor manejo integrado de enfermedades, con el fin de reducir el uso excesivo de plaguicidas químicos de amplio espectro para el control de estas enfermedades. Indudablemente, estas mejoras en el manejo integrado de enfermedades incluyen el uso de microorganismos con actividad antagonista, los cuales son colonizadores eficientes, producen metabolitos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos y actúan como promotores del crecimiento vegetal (Ezziyyani *et al.*, 2004). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio

areas pathogens that have not been identified as disease agents for apple trees. The major diseases of apple trees, including crown-rot root diseases, result from a complex of pathogens (Lamichhane and Venturi, 2015). The incidence, causal agents and pathogenicity of causal agents of crown-rot root diseases have scarcely been studied during the last three decades in apple orchards from Northern Mexico. Information in this regard is needed in this particular apple producing area to develop a better-integrated disease management in order to reduce the excessive use of broad-spectrum chemical pesticides to control these diseases. Undoubtedly, this improved integrated disease management include the use of microorganisms with antagonistic activity, which are efficient colonizers, produce metabolites that inhibit the growth of phytopathogens and act as plant growth promoters (Ezziyyani *et al.*, 2004). Thus, the aim of the present study was to estimate the incidence of root pathogens in apple orchards from Chihuahua, Mexico, identifying the fungi and Oomycetes probably involved in the diseases and evaluating their pathogenicity in commercial apple rootstocks. The antagonistic effect of some microorganisms against some of the identified Oomycetes was also determined *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental site and estimation of infection damage incidence

The incidence of roots with infection damage was determined on time in five orchards from the main apple-producing regions of Chihuahua, Mexico (Cuauhtémoc, Bachiniva, Namiquipa and Guerrero, Table 1) during June and July of 2013. The climate conditions and technification

fue estimar la incidencia de patógenos de la raíz en huertos de manzano de Chihuahua, México, identificando los hongos y Oomicetos probablemente involucrados en las enfermedades y evaluando su patogenicidad en portainjertos de manzano comerciales. También se determinó el efecto antagonista *in vitro* de algunos microorganismos contra algunos de los Oomicetos identificados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental y estimación de incidencia de daño infeccioso

La incidencia de raíces con daño infeccioso se determinó una vez, en cinco huertos de las principales regiones productoras de manzana de Chihuahua, México (Cuahtémoc, Bachíniva, Namiquipa y Guerrero, Cuadro 1) durante junio y julio del 2013. Las condiciones climáticas y el nivel de tecnificación variaron entre las áreas evaluadas. Quinientos árboles, distribuidos en 10 hileras, se evaluaron en cada huerto (10,000 árboles en total) en un diseño completamente al azar (Cuadro 1). Los síntomas de daño infeccioso de raíz considerados fueron marchitez, pobre crecimiento de los brotes, follaje pálido o amarillo, follaje necrótico, defoliación prematura, muerte regresiva de hojas y brotes terminales, manchas negras o cafés en los tallos, formación de cánceres y crecimiento irregular.

### Muestras de suelo y tejido

Se recolectó tejido enfermo (muestras de raíz y tallo de 10-20 cm de largo) y suelo cercano a la rizosfera (500-600 g) de 10 árboles con aparente daño infeccioso de raíces y de árboles libres de síntomas, de cada huerto para aislar los hongos y Oomicetos.

level varied among tested areas. Five hundred trees, distributed in 10 rows, were evaluated in each orchard (10,000 trees total) in a randomized design (Table 1). Root infection damage symptoms considered were wilting, poor shoot growth pale or yellow foliage, necrotic sparse foliage, premature defoliation, regressive death of leaves and terminal shoots, black or brown spots on the stems, cankers formation and irregular growth.

### Soil and tissue samples

Diseased tissue (root and stem samples of 10-20 cm of length) and soil near the rhizosphere (500-600 g) of ten apple trees with apparent root infection damage and free of infection damage were collected from each orchard to isolate fungal and Oomycetes.

### Isolation and purification of microorganisms

Three to five pieces (10-20 cm of length) of diseased tissue were washed with tap water to eliminate the excess of soil and subsequently cut into 1 cm pieces. The pieces were washed for 1 min with 0.5% sodium hypochlorite (NaOCl) solution, rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile brown wrapping paper in a biosafety hood (Envirco Corporation, Albuquerque, New Mexico, USA). Tissue subsamples (5 pieces each of 1 cm of length) were placed in triplicate in humid chambers (90-mm Petri dishes with moistened cotton). On the other hand, tissue subsamples (five pieces of 3-5 mm of length) were placed in triplicate on semi-selective media V8-agar [V8 juice, calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich) - agar (Sigma-Aldrich)] and potato-dextrose-agar (PDA; BD Bioxon). These two media contained antibiotics [pimaricin 0.1 g/L (Sigma-Aldrich, USA), rifampicin 0.01 g/L (Sigma, USA), oxytetracycline

**Cuadro 1. Huertos de manzano muestreados, ubicación geográfica, portainjertos plantados, edad de los árboles e incidencia de árboles de manzano con posible enfermedad de raíz en cuatro localidades del estado de Chihuahua, México.**  
**Table 1. Apple orchards sampled, geographical location, rootstock planted, age of the trees, and incidence of apple trees with putative root disease in four localities in the state of Chihuahua, Mexico.**

Localidades	Huertos	Portainjertos	Edad (años)	Nivel de tecnificación	Ubicación geográfica	msnm	Incidencia (%)
Cuahtémoc	Picacho lot 7	MM.111	1	High <sup>x</sup>	28°29'28"N, 106°40'08"W	2,020	4
	Picacho lot 6	MM.111	12	High <sup>x</sup>	28°29'31"N, 106°39'45"W	2,017	1
	Picacho lot 1A	MM.106	43	Medium <sup>y</sup>	28°29'23"N, 106°39'07"W	2,025	14
	Campo 2A	Bud 108, M.7	10	High <sup>x</sup>	28°26'40"N, 106°59'18"W	2,130	28
	Campana (Campo 4)	Standard	30	High <sup>y</sup>	28°33'49"N, 106°54'24"W	1,995	32
Namiquipa	Carlos Márquez	Standard	27	Medium <sup>y</sup>	29°11'03"N, 107°25'14"W	1,877	17
	Manuel Rivera	Standard	19	Medium <sup>y</sup>	29°08'53"N, 107°23'34"W	1,868	15
	Reyes Nevarez 1	Standard	18	Medium <sup>y</sup>	29°10'31"N, 107°22'27"W	1,900	13
	Reyes Nevarez 2	Standard	8	High <sup>x</sup>	29°09'32"N, 107°23'10"W	1,873	4
	Reyes Nevarez 3	Standard	30	Medium <sup>y</sup>	29°08'59"N, 107°23'30"W	1,889	28
Guerrero	El Encino	John Downie	5	Medium <sup>y</sup>	28°33'23"N, 107°27'21"W	2,084	12
	El Tanque	Standard	6	Medium <sup>y</sup>	28°33'36"N, 107°27'23"W	2,082	19
	Tres Compadres	Standard	6	Medium <sup>y</sup>	28°32'66"N, 107°27'10"W	2,099	14
	Gameros	Standard	4	Medium <sup>y</sup>	28°31'58"N, 107°26'57"W	2,096	24
	Las Margaritas	MM.111	3	Medium <sup>y</sup>	28°33'31"N, 107°29'37"W	2,012	19
Bachíniva	San Joaquin	Standard	44	Medium <sup>y</sup>	28°51'58"N, 107°15'57"W	1,991	40
	Rosy	MM.111	28	High <sup>x</sup>	28°51'45"N, 107°16'08"W	1,984	7
	Bety	MM.111	15	High <sup>x</sup>	28°51'29"N, 107°16'17"W	1,977	5
	Manuel	MM.111	15	High <sup>x</sup>	28°51'11"N, 107°15'39"W	1,979	2
	La Ciénega	Standard	34	Medium <sup>x</sup>	28°46'52"N, 107°15'21"W	2,009	33

msnm: metros sobre el nivel del mar / masl: meters above sea level.

<sup>x</sup>Alto: Irrigación por micro-aspersión, calefacción, malla antigranizo; <sup>y</sup>Medio: Riego rodado, calefacción, sin malla antigranizo, sin límite del uso de recursos y asistencia técnica ocasional (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2004) / <sup>x</sup>High: Micro-sprinkler irrigation, heating, hail mesh; <sup>y</sup>Medium: Rolled irrigation, heating, without hail mesh, without limiting the use of resources and casual technical assistance (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2004).

### Aislamiento y purificación de microorganismos

Se lavaron con agua corriente tres a cinco piezas (10-20 cm de largo) de tejido enfermo para eliminar el exceso de suelo y subsecuentemente se cortaron en piezas de 1 cm. Los pedazos se lavaron por 1 min con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5%, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron en papel estroza estéril en

0.03 g/L (Sigma, Germany)] (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Thus, 15 subsamples of 1 cm and 15 subsamples of 3-5 mm from each tree with and without infection damage symptoms were evaluated. All assays were performed at 28 °C for 5 d in an environmental chamber without light (Precision Scientific, Winchester, VA, USA). The fungi were purified on PDA medium, using a monospore culture technique, followed by incubation at 28 °C for 72-96 h. PARPH medium

una cabina de bioseguridad (Enviro Corporation, Albuquerque, New Mexico, EUA). Las submuestras de tejido (5 piezas de 1 cm de largo) se colocaron por triplicado en cámaras húmedas (cajas de Petri de 90-mm con algodón húmedo). Por otra parte, submuestras de tejido (cinco piezas de 3-5 mm de largo) se colocaron por triplicado en medios de cultivo semi-selectivos V8-agar [jugo V8, carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich) – agar (Sigma-Aldrich)] y papa-dextrosa-agar (PDA; BD Bioxon). Estos dos medios contenían antibióticos [pimaricina 0.1 g/L (Sigma-Aldrich, EUA), rifampicina 0.01 g/L (Sigma, EUA), oxytetraciclina 0.03 g/L (Sigma, Alemania)] (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Por lo tanto, se evaluaron 15 submuestras de 1 cm y 15 submuestras de 3-5 mm de cada árbol con y sin síntomas de daño infeccioso. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 28 °C por 5 d en una cámara ambiental sin luz (Precision Scientific, Winchester, VA, EUA). Los hongos fueron purificados en medio PDA usando la técnica de cultivo monospórico, seguido por una incubación a 28 °C por 72-96 h. Para el aislamiento de Oomicetos, se usó el medio PARPH [17 g/L de medio de harina de maíz (Analytical Fluka, Sigma); 0.10 g/L pentacloronitrobenzenceno (PCNB), 0.27 g/L ampicilina (Sigma) y 0.01 g/L rifampicina (Sigma)]. Estos microorganismos fueron incubados bajo las mismas condiciones que los hongos.

Las especies de *Trichoderma* se aislaron por diluciones seriadas (1:10) de suelo tamizado (1 g) de árboles con y sin síntomas de daño infeccioso en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada estéril (0.1% peptonina y 0.85% NaCl en agua destilada). Se sembraron por triplicado alícuotas (50 µL) de las diluciones (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup>) por la técnica de difusión en cajas de Petri de 90-mm que contenían medio PDA adicionado con antibióticos indicados previamente (Schoenborn *et al.*, 2004).

[17 g/L of corn meal agar medium (Analytical Fluka, Sigma); 0.10 g/L pentachloronitrobenzene (PCNB), 0.27 g/L ampicillin (Sigma) and 0.01 g/L rifampicin (Sigma)] was used to isolate Oomycetes. These microorganisms were incubated under the same conditions than fungi.

The *Trichoderma* species were isolated by serial dilutions (1:10) of sieved soil (1 g) from diseased and disease symptom-free trees in test tubes containing 9 mL of sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl in distilled water). Aliquots (50 µL) of the prepared dilutions (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>6</sup>) were spread in triplicate by diffusion technique on 90-mm Petri dishes containing PDA medium added of the antibiotics previously indicated (Schoenborn *et al.*, 2004).

#### **Morphological and molecular identification of microorganisms**

Fungi and Oomycetes were purified on PDA medium without antibiotics (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a) and identified at genus level using taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1972; Dugan, 2006; Watanabe, 2010), according to their morphological characters observed in an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The identity of these microorganisms was confirmed molecularly.

The genomic DNA (gDNA) was extracted and used to perform the identity analysis of the fungal isolates based on their molecular characters. For this purpose, an explant of the purified fungi was placed on a Petri dish containing PDA medium, covered with sterile cellophane and incubated at 28 °C for 7 d. The mycelia was collected and placed in a porcelain mortar with a buffer (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) at 70 °C. The mycelia was macerated according to Raeder and Broda (1985). The

### Identificación morfológica y molecular de microorganismos

Los hongos y Oomicetos fueron purificados en medio PDA sin antibióticos (Tewoldemedhin *et al.*, 2011a) e identificados a nivel de género utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972; Dugan, 2006; Watanabe, 2010), de acuerdo con sus caracteres morfológicos observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania). La identidad de estos microorganismos fue confirmada molecularmente.

El ADN genómico (ADNg) fue extraído y usado para llevar a cabo el análisis de identidad de los aislados fúngicos, basados en sus caracteres moleculares. Para este propósito, un explante del hongo purificado se colocó en una caja de Petri que contenía medio PDA, se cubrió con celofán estéril y se incubó a 28 °C por 7 d. Se recolectó el micelio y se colocó en un mortero de porcelana con un amortiguador (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) a 70 °C. El micelio se maceró de acuerdo con Raeder y Broda (1985). El ADNg obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y subsecuentemente se usó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 y 5, por sus siglas en inglés) del ADNr, usando los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una etapa final de extensión a 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y subsecuentemente purificados usando el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, California, EUA),

obtained gDNA was visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel and subsequently used to amplify the internal transcribed spacers (ITS 4 and 5) of the rDNA, using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). The amplification conditions included an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR products were examined by electrophoresis on a 1% agarose gel and were subsequently purified using the DNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research, California, USA), according to the manufacturer's instructions. These products were sequenced at Macrogen (Rockville, MD, USA). The obtained sequences were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity corresponding to the identified species. The nucleotide sequences obtained in the present study have not been deposited in NCBI.

### Pathogenicity tests in apple rootstocks.

The Koch's postulates were performed under greenhouse conditions using 15 pathogens (eight fungi and seven Oomycetes) isolated from the rhizosphere of apple trees with and without root infection damage symptoms. One year old trees of the 12 most planted rootstocks in Mexico (G.30, G.41, G.202, G.222, G.935, M.7, M.25, MM.106, MM.111, Bud 118, Bud 9 and Standard) were purchased from two nurseries in Cuauhtemoc, Chihuahua ("Viveros Sacramento" and "Vivero Los Cienes"). Five trees of each rootstock were inoculated with each pathogen. Additionally, five trees of each rootstock were used as control group (without inoculum).

de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos productos fueron secuenciados en MacroGen (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra las bases de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies identificadas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente estudio no han sido depositadas en el NCBI.

### Pruebas de patogenicidad en portainjertos de manzano

Los postulados de Koch se realizaron bajo condiciones de invernadero utilizando 15 patógenos (ocho hongos y siete Oomicetos) aislados de la rizosfera de árboles de manzano con y sin síntomas de daño infeccioso en raíz. Se adquirieron árboles de manzano de 1 año de edad de los 12 portainjertos más plantados en México (G.30, G.41, G.202, G.222, G.935, M.7, M.25, MM.106, MM.111, Bud 118, Bud 9 y Estándar), de dos viveros en Cuauhtémoc, Chihuahua (“Viveros Sacramento” y “Vivero Los Cienes”). Se inocularon cinco árboles de cada portainjerto con cada patógeno. Adicionalmente, se utilizaron cinco portainjertos como grupo testigo (sin inóculo).

Los árboles se plantaron en bolsas negras de polietileno (5 L) conteniendo sustrato previamente esterilizado a 121 °C y 15 psi. El sustrato estaba compuesto por suelo franco, vermiculita y peat moss (1: 1: 1). Dos meses después del trasplante, los árboles fueron inoculados con 10 mL de inóculo de hongos u Oomicetos sin cuantificar (Hantula *et al.*, 2000). El inóculo tenía 3 d edad y fue crecido en caldo vegetal V8 [jugo V8 (Campbell’s™) y carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich)] a 28 °C en un agitador orbital a 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Los portainjertos inoculados se mantuvieron por otros dos meses bajo con-

The trees were planted in dark polyethylene bags (5 L) containing substrate previously sterilized at 121 °C and 15 psi. The substrate was composed by loam soil, vermiculite and peat moss (1: 1: 1). Two months after planting, the trees were inoculated with 10 mL of unquantified fungi or Oomycetes inoculum (Hantula *et al.*, 2000). The inoculum was 3 d old and grown in vegetable broth V8 [V8 juice (Campbell’s™) and calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>, Sigma Aldrich)] at 28 °C under orbital shaking at 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). The inoculated rootstocks were maintained for another two months under greenhouse conditions (Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). During this time, the characteristic symptoms resulting from the fungal and Oomycete infections were monitored weekly. The Oomycetes and fungal isolates causing the death of trees or severe symptoms of damage in roots, stems, leaves and shoots after two months of the inoculation were considered as pathogenic.

### *In vitro* antagonistic activity

Four fungal isolates and two antagonistic bacteria isolates were confronted against seven Oomycetes isolates. The antagonists included a *Trichoderma asperellum* and two *Bacillus* species previously identified (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

The activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates was evaluated *in vitro* against the Oomycetes obtained from apple orchards. For this purpose, confrontations were performed (*Trichoderma* spp. vs Oomycetes) using a dual culture technique in Petri dishes (90 mm) containing Potato-Dextrose-Agar (PDA). A paper filter disc (6 mm) containing the mycelium and conidia unquantified of the pathogen was placed on one side of the dish and another filter paper disc containing the mycelium and conidia unquantified of the antagonist was



diciones de invernadero (Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Durante este tiempo, se monitorearon semanalmente los síntomas característicos resultado de las infecciones de hongos y Oomicetos. Se consideraron como patogénicos a los aislados de hongos y Oomicetos que causaron la muerte de los árboles o que causaron síntomas severos de daño en las raíces, tallos, hojas y brotes después de 2 meses de la inoculación.

### Actividad antagónica *in vitro*

Se confrontaron cuatro aislados de hongos y dos de bacterias antagonistas contra siete aislados de Oomicetos. Se incluyeron los antagonistas *Trichoderma asperellum* y dos especies de *Bacillus* previamente identificados (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Se evaluó la actividad *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* contra los Oomicetos obtenidos de huertos de manzano. Para este propósito, se realizaron confrontaciones (*Trichoderma* spp. vs Oomicetos) usando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri (90 mm) conteniendo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Se colocó un disco de papel filtro (6 mm) conteniendo el micelio y conidias sin cuantificar del patógeno en un lado de la caja y se colocó otro disco de papel filtro conteniendo el micelio y conidias sin cuantificar del antagonista, en el lado opuesto de la caja. Las confrontaciones de *Bacillus* spp. vs Oomicetos, se realizaron colocando un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro del patógeno (micelio y conidias sin cuantificar) en el centro de la caja Petri conteniendo PDA, mientras que la bacteria fue inoculada, el mismo día que el fitopatógeno, en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri usando círculos de papel filtro (6 mm de diámetro con inóculo de 48 h de edad) (Figura 1).

Tanto los testigos de patógenos y antagonistas se colocaron individualmente en el centro de la caja de Petri y se realizaron por triplicado con 10 unidades

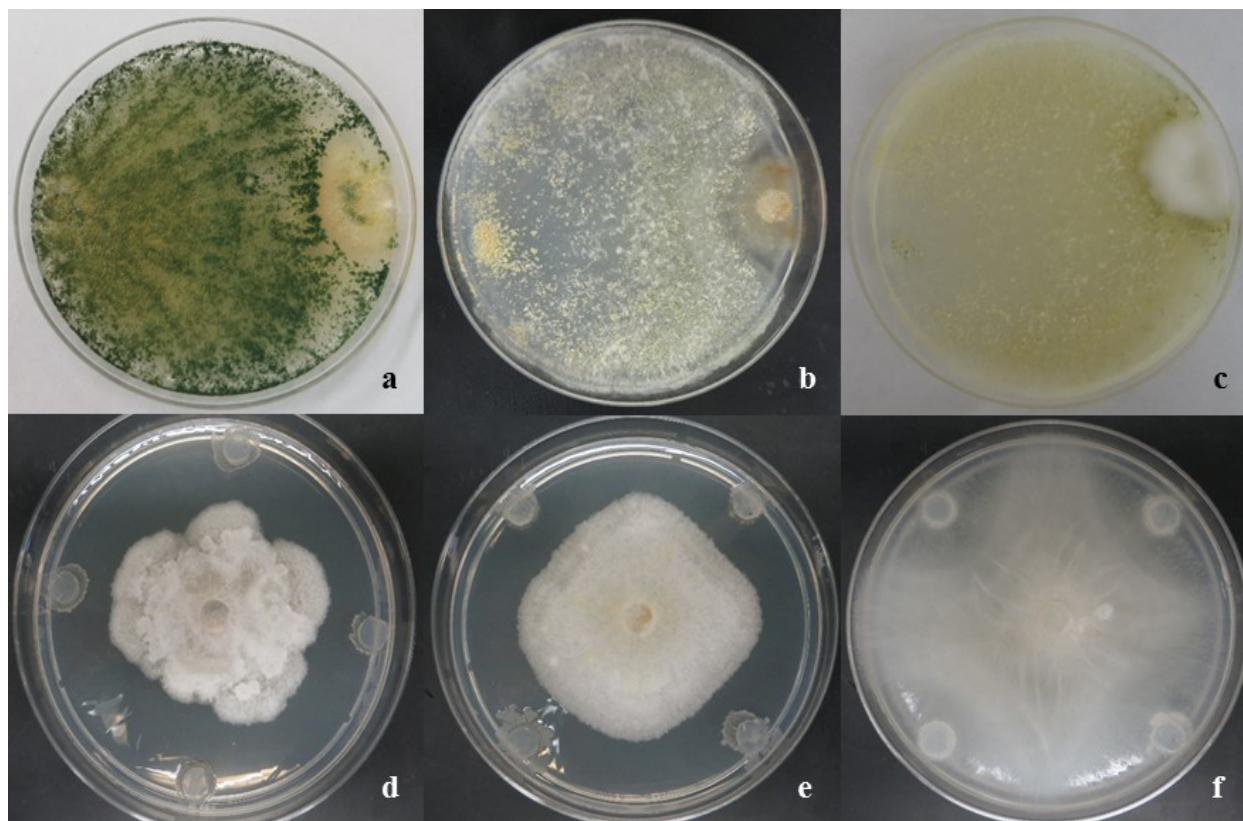
placed on the opposite side of the dish. The *Bacillus* spp. vs Oomycetes confrontations were performed by placing one filter paper circle of 6 mm in diameter of the pathogen (mycelium and conidia unquantified) in the center of a Petri dish containing PDA, whereas the bacteria were inoculated on the cardinal points of the Petri dish using filter paper circles (6 mm in diameter with the 48 h old inoculum), the same day that the phytopathogens (Figure 1).

Controls, both antagonist and pathogen, were placed individually in the center of the Petri dish, and were performed in triplicate with ten experimental units each. The dishes were incubated at 28 °C in a Precision Scientific incubator (Model 31534), and systematic measurements of the radial growth of the fungal colonies confronted with antagonistic fungi and bacteria, and the control dishes, respectively, were performed every 24 h for eight days.

The possible antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., was evaluated in terms of radial growth of the pathogen (RGP), radial growth of the antagonist (RGA), and percentage inhibition of radial growth (PIRG). The PIRG was evaluated according to Ezziyyani *et al.* (2004) using the formula  $PIRG = (R1 - R2) / R1 \times 100$ , where R1 is the radial growth of the control pathogen, and R2 is the radial growth of the pathogen in the confrontation, while that of the antagonist type was measured according to Bell's scale (Bell *et al.*, 1982).

### Statistical analysis

Both bioassays were performed in triplicate, with ten Petri dishes per replicate for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation, using a completely randomized design with the following six treatments: four antagonistic fungal isolates



**Figura 1.** Micoparasitismo de especies de *Trichoderma* (a-c); a) *T. asperellum* vs *Pythium ultimum*; b) *T. harzianum* vs *Pythium* sp.; c) *T. atroviride* vs *Phytophthora cactorum*; y halos de inhibición de especies de *Bacillus* (d-f); d) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; e) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; f) *B. methylotrophicus* vs *Pythium ultimum* al sexto día post-inoculación *in vitro*.

**Figure 1.** Mycoparasitism of *Trichoderma* species (a-c); a) *T. asperellum* vs *Pythium ultimum*; b) *T. harzianum* vs *Pythium* sp.; c) *T. atroviride* vs *Phytophthora cactorum*; and inhibition halos of *Bacillus* species (d-f); d) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; e) *B. amyloliquefaciens* vs *Phytophthora cactorum*; f) *B. methylotrophicus* vs *Pythium ultimum* at 6th d post-inoculation *in vitro*.

experimentales cada una. Las cajas se incubaron a 28 °C en una incubadora Precision Scientific (Modelo 31534) y se realizaron mediciones sistemáticas cada 24 h por ocho días, del crecimiento radial de las colonias de hongos confrontadas con los hongos y bacterias antagonistas y las cajas testigo, respectivamente.

Se evaluó la posible actividad antagonista de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en términos de

and two antagonistic bacteria isolates confronted against seven Oomycetes isolates, with one control for each microorganism, where each treatment was an antagonist microorganism with 30 Petri dishes. The PIRG data and inhibition halo were analyzed using the Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002) for a balanced analysis of variance (ANOVA), and the means were separated using Tukey's test ( $p = 0.05$ ).

crecimiento radial del patógeno (CRP), crecimiento radial del antagonista (CRA) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Se evaluó el PICR de acuerdo con Ezziyyani *et al.* (2004) usando la fórmula  $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$ , donde R1 es el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 es el crecimiento radial del patógeno en la confrontación, mientras que el tipo de antagonismo fue medido de acuerdo con la escala de Bell (Bell *et al.*, 1982).

### Análisis estadístico

Ambos ensayos se realizaron por triplicado, con diez cajas de Petri por repetición para cada evaluación *in vitro* de bacteria-hongo, usando un diseño completamente al azar con los siguientes seis tratamientos: cuatro aislados de hongos antagonistas y dos aislados de bacterias antagonistas confrontadas contra siete aislados de Oomicetos, con un testigo para cada microorganismo, mientras que cada tratamiento constó de un microorganismo antagonista con 30 cajas de Petri. Los datos del PICR y el halo de inhibición se analizaron usando el Sistema de Análisis Estadístico versión 9.0 (SAS, 2002) para un análisis de varianza (ANVA), y las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Incidencia de daño infeccioso en raíces

La incidencia total de enfermedades de raíz en los huertos muestreados fue de 17%. Dicha incidencia osciló de 1 a 32% y de 4 a 28% en huertos de Cuauhtémoc y Namiquipa, respectivamente, con una incidencia promedio de 16% para ambas áreas. En Guerrero y Bachíniva, la incidencia fluctuó de 12 a 24% y de 2 a 40%, respectivamente,

## RESULTS AND DISCUSSION

### Incidence of roots infection damage

The total incidence of root disease in sampled orchards was 17%. This incidence ranged from 1 to 32% and from 4 to 28% in the orchards from Cuauhtémoc and Namiquipa respectively, with an average incidence of 16% for both areas. In Guerrero and Bachíniva, the incidence ranged from 12 to 24% and from 2 to 40%, respectively, with an average incidence of 17% for both areas (Table 1). The highest incidence was observed in “San Joaquin” and “La Ciénega” orchards, located in Bachíniva, probably as a consequence of the advanced age of the trees (44 and 34 years old, respectively) and the medium level of technification making them more susceptible to the attack of the phytopathogens. The climate conditions of this region, which were better for the growth of the microorganisms might also be involved in this high incidence of infection damage of roots.

The incidence values probably depended of the technification level (mainly the irrigation method), climate conditions, soil type, unrecognized interactions among phytopathogens, rootstocks, differences in horticultural practices and age of the trees in each orchard. It is also important to consider that in some orchards, farmers apply organic matter to the soil, which could favor the establishment of antagonistic microorganisms, improving their development and thus avoiding the growth of phytopathogens (Kamal *et al.*, 2010). The variability of incidence values for each orchard and locality might be consequence of the pathogenicity and virulence of the microorganism (Wilcox, 1993). Manici *et al.* (2013) also observed that the incidence of root diseases varied considerably among regions and the severity of the disease was attributed to the fungi composing the microorganism complex.

con una incidencia promedio de 17% para ambas áreas (Cuadro 1). La incidencia más alta se observó en los huertos “San Joaquín” y “La Ciénega”, localizados en Bachíniva, probablemente como consecuencia de la avanzada edad de los árboles (44 y 34 años, respectivamente) y el nivel medio de tecnificación, haciéndolos más susceptibles al ataque de los fitopatógenos. Las condiciones climáticas de ésta región, las cuales son mejores para el crecimiento de los microorganismos, también pueden estar involucradas en esta alta incidencia de daño infeccioso de raíces.

Los valores de incidencia probablemente dependen del nivel de tecnificación (principalmente el método de riego), las condiciones climáticas, el tipo de suelo, las interacciones sin reconocer entre patógenos, el portainjerto, las diferencias en las prácticas hortícolas y la edad de los árboles en cada huerto. Además, es importante considerar que en algunos huertos, los agricultores aplican materia orgánica al suelo, lo que puede favorecer el establecimiento de microorganismos antagonistas, mejorando su desarrollo y, por lo tanto, evitando el crecimiento de fitopatógenos (Kamal *et al.*, 2010). La variabilidad de los valores de incidencia para cada huerto y localidad, pueden ser consecuencia de la patogenicidad y virulencia de los microorganismos (Wilcox, 1993). Manici *et al.* (2013) también observaron que la incidencia de enfermedades de raíces varió considerablemente entre regiones y la severidad de las enfermedades se atribuyó a la composición del complejo de hongos.

Las enfermedades de pudrición de corona y raíz en huertos de manzano son problemas importantes alrededor del mundo. Manici *et al.* (2013) observaron una alta incidencia de infecciones causadas por *Pythium* spp. y las infecciones causadas por especies de *Fusarium* fueron altamente asociadas a enfermedades de replante. Este problema también se observó en el presente estudio para los portainjertos de

The crown and root rot diseases in apple orchards are important problems worldwide. Manici *et al.* (2013) observed a high incidence of infections caused by *Pythium* spp. and that infections caused by *Fusarium* species were highly associated to replanting diseases. This problem was also observed in the present study for 1-year-old apple rootstocks (MM.111) in “El Picacho Lot 7” orchard from Cuauhtémoc, with a high technification level. According to Ramírez-Legarreta *et al.* (2004), the level of technification (medium and high) in apple orchards directly affect the disease incidence primarily through micro-sprinkler type or rolled irrigation but heating type, use of hail mesh, use of inputs and ongoing or casual technical assistance are also involved, among other factors. However, most of the orchards sampled in the present study with a medium technification level showed the presence of *P. cactorum* and *Pythium* spp. and particularly the fungus *F. oxysporum*, which, in some cases, could be attributed to the type of orchard management being a potential determining factor in the incidence of pathogens, including the causal agents of crown and root rot diseases. Importantly, the orchards with a high level of technification have permanent technical assistance, which helps in the early detection of diseases for their prevention and management.

### **Morphological and molecular identification of the microorganisms**

Microorganisms associated with root disease symptoms in apple trees were the Oomycetes *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. and the fungi *Fusarium* spp., *Gibberella* spp. (*Fusarium* spp. teleomorph), *Bionectria ochroleuca*, *Clonostachys* sp., *Alternaria* spp., and *Phymatotrichopsis* sp. These microorganisms were identified according to their morphological characters and genomic

manzano de 1 año de edad (MM.111) en “El Pica-cho Lot 7” huerto de Cuauhtémoc, con un alto nivel de tecnificación. De acuerdo con Ramírez-Legarreta *et al.* (2004), el nivel de tecnificación (medio y alto) en huertos de manzano, afectan directamente la incidencia de enfermedades, principalmente mediante el tipo de micro aspersión o riego rodado, pero también del tipo de calefacción, uso de malla anti-granizo, uso de insumos y asistencia técnica continua u ocasional, también están involucradas, entre otros factores. Sin embargo, la mayoría de los huertos muestreados en el presente estudio, con un nivel medio de tecnificación, mostraron la presencia de *P. cactorum* y *Pythium* spp. y particularmente el hongo *F. oxysporum*, lo cual, en algunos casos, se puede atribuir al tipo de manejo del huerto, siendo un factor determinante potencial en la incidencia de los patógenos, incluyendo los agentes causales de enfermedades de cuello y raíz. Es importante destacar que los huertos con un alto nivel de tecnificación, cuentan con asistencia técnica permanente, la cual ayuda en la detección temprana de enfermedades para su prevención y manejo.

### Identificación morfológica y molecular de microorganismos

Los microorganismos asociados con los síntomas de enfermedades de raíz en huertos de manzano fueron los Oomicetos *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. y los hongos *Fusarium* spp, *Gibberella* spp. (teleomórfo de *Fusarium* spp.), *Bionectria ochroleuca*, *Clonostachys* sp., *Alternaria* spp., y *Phymatotrichopsis* sp. Estos microorganismos fueron identificados de acuerdo con sus caracteres morfológicos y secuencias genómicas. El género *Fusarium* spp., fue el más frecuentemente observado (67.3%, 202 aislados), con 32.3% (97 aislados) de este género, pertenecientes a *F. oxysporum*. Las especies restantes de éste género fueron *F. solani*,

sequences. The genus *Fusarium* spp. was the most frequently observed (67.3%, 202 isolates), with 32.3% (97 isolates) of this genus belonging to *F. oxysporum*. The remainder species of this genus were *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. sacchari*, *F. succisae*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* and *F. equiseti*. This distribution of species of the genus *Fusarium* is similar to that found in other geographic locations worldwide (Serdani *et al.*, 2002; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Leslie *et al.* (2007) found that *F. succisae* is phylogenetically closely related to *F. proliferatum*, which has been associated with apple seedlings in China (Ju *et al.*, 2014). Both *F. fujikuroi* and *F. sacchari* were associated with rice, sugarcane and corn plots from Peninsular Malaysia (Hsuan *et al.*, 2011), while *F. equiseti* was associated with apple tree rhizosphere in Chihuahua, Mexico (Pérez-Corral *et al.*, 2015). In addition, Carreri *et al.* (2013) isolated *F. tricinctum* from onion roots and bulbs in southern Italy. However, an association between the *Fusarium* species and apple tree rhizosphere has not been reported. Thus, *F. fujikuroi*, *F. sacchari*, *F. tricinctum* and *F. subglutinans* are considered for the first time as pathogenic for apple roots.

The second most frequently observed genus was *Fusarium* teleomorph (*Gibberella* spp.), with 15% (45 isolates belonging *G. moniliformis* anamorph: *Fusarium verticillioides* and *G. intermedia* anamorph: *Fusarium proliferatum*), followed by *Bionectria ochroleuca* (12%, 36 isolates), *Alternaria* spp. (17%, 5 isolates) comprising mainly *A. brassicae* and *A. alternata*, *Clonostachys* sp. (1.3%, 4 isolates), *Phytophthora cactorum* (1.3%, 4 isolates), *Pythium* spp. (0.7%, 3 isolates), *Phymatotrichopsis* sp. (0.3%, 1 isolate) (Table 2). Scherm *et al.* (2013) demonstrated that the teleomorph of *Fusarium* species (*Gibberella* spp.) can be found in other crops. In addition, the Oomycetes *P. cactorum* and *Pythium* spp. found

*F. subglutinans*, *F. sacchari*, *F. succisae*, *F. tricinctum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. equiseti*. Ésta distribución de especies del género *Fusarium* es similar a lo encontrado en otras regiones geográficas alrededor del mundo (Serdani *et al.*, 2002; Tewoldemedhin *et al.*, 2011a). Leslie *et al.* (2007) encontraron que *F. succisae* está filogenéticamente relacionado con *F. proliferatum*, la cual ha sido asociada con plántulas de manzano en China (Ju *et al.*, 2014). Tanto *F. fujikuroi* y *F. sacchari*, fueron asociadas con arroz, caña de azúcar y parcelas de maíz de la Península de Malasia (Ju *et al.*, 2014), mientras que *F. equiseti* ha sido asociada con la rizosfera de árboles de manzano en Chihuahua, México (Pérez-Corral *et al.*, 2015). Además, Carreri *et al.* (2013) aislaron *F. tricinctum* de raíces y bulbos de cebolla en el sur de Italia. Sin embargo, no se ha reportado una asociación entre las especies de *Fusarium* y la rizosfera de árboles de manzano. Por lo tanto, se considera que es la primera vez que se reportan a *F. fujikuroi*, *F. sacchari*, *F. tricinctum* and *F. subglutinans* como patógenicos para las raíces de manzano.

El segundo género más frecuentemente observado fue el teleomórfo de *Fusarium* (*Gibberella* spp.), con 15% (45 aislados pertenecientes a *G. moniliformis* anamórfo: *Fusarium verticillioides* y *G. intermedia* anamórfo: *Fusarium proliferatum*), seguidos por *Bionectria ochroleuca* (12%, 36 aislados), *Alternaria* spp. (17%, 5 aislados) que comprenden principalmente *A. brassicae* y *A. alternata*. *Clonostachys* sp. (1.3%, 4 aislados), *Phytophthora cactorum* (1.3%, 4 aislados), *Pythium* spp. (0.7%, 3 aislados), *Phymatotrichopsis* sp. (0.3%, 1 aislado) (Cuadro 2). Scherm *et al.* (2013) demostraron que el teleomórfo de las especies de *Fusarium* (*Gibberella* spp.), puede ser encontrado en otros cultivos. Además, los Oomicetos *P. cactorum* y *Pythium* spp. encontrados en este estudio, fueron distribuidos diferencialmente entre los huertos.

in this study were differentially distributed among the orchards. These species have been reported as the main causal agents of crown, collar and root rot in apples in other countries (Roiger and Jeffers, 1991; Yao *et al.*, 2006). Other species, such as *B. ochroleuca*, *A. alternata* and *A. brassicae*, have also been associated with core rot in apple trees in South Africa (Serdani *et al.*, 2002). Moreover, *P. omnivora*, the causal agent of Texas root rot, has been reported as a pathogen that causes important economic losses in different crops in northern Mexico and southern USA, particularly in cotton and walnut trees, reflecting its adaptability to a wide range of climatic conditions (Samaniego-Gaxiola, 2007) and being a potential causal agent of root diseases in other fruit trees. The present study reports for the first time the fungus *Phymatotrichopsis* sp. as a pathogenic agent for roots in apple orchards from Mexico. In addition, four *Trichoderma* species were obtained from soil samples, being *Trichoderma gamsii* the most frequently observed antagonist, with 72.5%, followed by *T. hamatum*, *T. harzianum* and *T. atroviride* with 15, 7.5, and 5%, respectively (Table 2).

### Pathogenicity tests

The susceptibility of the rootstocks to tested fungi and Oomycetes is shown in Table 3. All rootstocks were susceptible to at least two of the isolates, except G.935, which was resistant to the tested isolates of fungi and Oomycetes. The G.30, G.202 and G.41 rootstocks were the most susceptible to 13, 10 and 9 of the tested pathogens, respectively. *Pythium ultimum* was the most pathogenic, causing diseases in 100% of the tested trees (Table 3). Although the G.30 and MM.111 were highly susceptible rootstocks (more than 50-75%), they are widely planted in the apple producing areas of Chihuahua, Mexico.

**Cuadro 2. Aislados de hongos y Oomicetos y posibles hongos antagonistas, identificados molecularmente, asociados a árboles de manzano con aparente enfermedad de raíz y libres de síntomas de cuatro localidades en el estado de Chihuahua, México, y su ocurrencia (%).****Table 2. Fungi and Oomycetes isolates and putative fungal antagonists, molecularly identified, associated to apparently root diseased and diseased symptom-free apple trees from four localities in the state of Chihuahua, Mexico, and their occurrence rate (%).**

Fitopatógenos y Antagonistas	Cuauhtémoc		Namiqipa		Guerrero		Bachíniva		Total (%)
	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Picacho (lot 7, lot 6), Campo 2A, Campana (Campo 4)	MM.111, Bud 108, M.7, Standard (15.0)	Reyes Nevarez 1, Carlos Márquez, Reyes Nevarez 3, Manuel Rivera	Standard (4.4)	Las Margaritas	MM.111 (6.4)	San Joaquin, La Ciénega	Standard (6.8)	32.6
<i>Bionectria ochroleuca</i>	Campana (Campo 4), Picacho lot 1A, Campo 2A	Standard, MM. 106, Bud 108, M.7 (10.0)	Reyes Nevarez 1, Reyes Nevarez 3	Standard (1.0)	—	—	Bety	Standard (1.0)	12.0
<i>Fusarium solani</i>	Campana (Campo 4), Picacho lot 7, Campo 2A	Standard, MM. 111, Bud 108, M.7 (8.0)	Reyes Nevarez 3	Standard (0.5)	—	—	Rosy	Standard (0.7)	9.2
<i>Gibberella moniliformis</i>	Campana (Campo 4), Picacho lot 1A, Campo 2A	Standard, MM. 106, Bud 108, M.7 (7.0)	Reyes Nevarez 1, Carlos Márquez	Standard (1.4)	El Tanque	Standard (0.3)	—	—	8.7
<i>Fusarium subglutinans</i>	Campana (Campo 4), Picacho (lot 6, lot 7, lot 1A)	Standard, MM.111, MM. 106 (7.0)	Carlos Márquez, Reyes Nevarez 3	Standard (1.4)	—	—	—	—	8.4
<i>Fusarium sacchari</i>	Campana (Campo 4),	Standard (4.0)	—	—	—	—	San Joaquin, Bety	Standard, MM. 111 (3.1)	7.1
<i>Gibberella intermedia</i>	Campana (Campo 4), Campo 2A	Standard, Bud 108, M.7 (5.0)	—	—	—	—	La Ciénega, San Joaquín	Standard (1.4)	6.4
<i>Fusarium succisae</i>	Picacho lot 7, Campo 2A	MM. 111, Bud 108, M.7 (4.1)	Carlos Márquez	Standard (1.0)	—	—	—	—	5.1
<i>Fusarium tricinctum</i>	Campana (Campo 4), Picacho lot 7, Campo 2A	Standard, MM. 111, Bud 108, M.7 (1.3)	—	—	—	—	La Ciénega	Standard (0.7)	2.0
<i>Fusarium</i> sp.	Picacho lot 1A	MM. 106 (1.1)	—	—	Las Margaritas	MM. 111 (0.7)	—	—	1.8
<i>Clonostachys</i> sp.	Picacho lot 1A	MM. 106 (1.3)	—	—	—	—	—	—	1.3

Cuadro 2. Continúa.

Fitopatógenos y Antagonistas	Cuauhtémoc		Namiquipa		Guerrero		Bachíniva		Total (%)
	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	Huerto	Portainjerto	
<i>Phytophthora cactorum</i> <sup>x</sup>	Picacho lot 7	MM. 111 (1.0)	Reyes Nevarez 3	Standard (0.3)	—	—	—	—	1.3
<i>Pythium</i> spp.	Picacho lot 7	MM. 111 (0.7)	—	—	Las Margaritas	MM. 111 (0.3)	—	—	1.0
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Picacho lot 1A, Campana (Campo 4)	Standard, MM. 106 (0.7)	—	—	—	—	—	—	0.7
<i>Fusarium proliferatum</i>	Picacho lot 1A, Campana (Campo 4)	Standard, MM.106 (0.7)	—	—	—	—	—	—	0.7
<i>Alternaria brassicae</i>	Picacho lot 1A	MM.111 (0.7)	—	—	—	—	—	—	0.7
<i>Alternaria</i> sp.	—	—	—	—	Tres Compadres	Standard (0.3)	—	—	0.3
<i>Alternaria alternata</i>	—	—	—	—	Gameros	Standard (0.3)	—	—	0.3
<i>Fusarium equiseti</i>	Picacho lot 7	MM. 111 (0.2)	—	—	—	—	—	—	0.2
<i>Phymatotrichopsis</i> sp. <sup>x</sup>	Picacho lot 7	MM. 111 (0.2)	—	—	—	—	—	—	0.2
<b>Total</b>		<b>68</b>		<b>10</b>		<b>8</b>		<b>14</b>	<b>100</b>
<i>Trichoderma gamsii</i> <sup>y</sup>	Picacho lot 1A, Picacho lot 7, Campo 2A	MM.111, MM.106, Bud 108, M.7 (65.0)	Reyes Nevarez 2	Standard (5.0)	—	—	Manuel, Bety	MM. 111 (2.5)	72.5
<i>Trichoderma hamatum</i> <sup>y</sup>	—	—	Reyes Nevarez 2	Standard (2.5)	Gameros, Tres Compadres	Standard (12.5)	—	—	15.0
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>y</sup>	Picacho lot 6	MM. 111 (5.0)	—	—	—	—	Bety, Rosy	MM. 111 (2.5)	7.5
<i>Trichoderma atroviride</i> <sup>y</sup>	Campo 2A	Bud 108, M.7 (5.0)	—	—	—	—	—	—	5.0
<b>Total</b>		<b>75</b>		<b>7.5</b>		<b>12.5</b>		<b>5</b>	<b>100</b>

<sup>x</sup> Aislados de Oomicetos y hongos identificados de acuerdo con sus caracteres morfológicos / <sup>x</sup> Oomycete and fungal isolates identified according to their morphological characters.

<sup>y</sup> Posibles hongos antagonistas / <sup>y</sup> Putative antagonistic fungi.



Estas especies han sido reportadas como los principales agentes causales de pudriciones de cuello, corona y raíz en manzanos en otros países (Roiger y Jeffers, 1991; Yao *et al.*, 2006). Otras especies tales como *B. ochroleuca*, *A. alternata* y *A. brassicae*, también han sido asociadas con pudriciones en árboles de manzano en Sudáfrica (Serdani *et al.*, 2002). Por otra parte, *P. omnivora*, el agente causal de la pudrición texana de la raíz, ha sido reportado como patógeno que causa pérdidas económicas importantes en diferentes cultivos en el norte de México y el sur de Estados Unidos de América, particularmente en algodón y nogales, reflejando su adaptabilidad a una amplia gama de condiciones climáticas (Samaniego-Gaxiola, 2007), y siendo un potencial agente causal de enfermedades de raíz en otros árboles frutales. El presente estudio reporta por primera vez el hongo *Phymatotrichopsis* sp., como agente patógeno de raíces en huertos de manzano de México. Además se obtuvieron cuatro especies de *Trichoderma* de muestras de suelo, siendo *Trichoderma gamsii* el antagonista más frecuentemente observado con 72.5%, seguido por *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. atroviride* con 15, 7.5 y 5%, respectivamente (Cuadro 2).

### Pruebas de patogenicidad

En el Cuadro 3, se muestra la susceptibilidad de los portainjertos a hongos y Oomicetos. Todos los portainjertos fueron susceptibles al menos a dos de los aislados, excepto G.935, el cual fue resistente a los aislados de hongos y Oomicetos probados. Los portainjertos G.30, G.202 y G.41 fueron los más susceptibles a 13, 10 y 9 de los patógenos evaluados, respectivamente. *Pythium ultimum* fue el más patogénico, causando enfermedades en el 100% de los árboles probados (Cuadro 3). Aunque los portainjertos G.30 y MM.111 fueron altamente susceptibles (más de 50-75%), son ampliamente

These rootstocks showed symptoms of infection with five Oomycete isolates, with *P. cactorum* C1 and *Pythium ultimum* isolates being the most pathogenic. These rootstocks along with MM.106 have been reported as the most susceptible to these pathogens (Roiger and Jeffers, 1991; Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Similar results were found by Latorre *et al.* (2001) after inoculation of *Phytophthora* isolates, with *P. cactorum* resulting the most virulent and pathogenic to M.9, M.25, MM.106 and MM.111 apple rootstocks. The Standard rootstock was only susceptible to two *Pythium* species, *P. irregulare* and *P. ultimum* with 80 and 60%, respectively (Table 3). This finding is contrary to that was observed in tested orchards, where the highest incidence of infection damage of roots was found on Standard rootstocks. However, this could be related to the age of the trees (30-40 years old), making them more susceptible to the attack of phytopathogens. Most of tested rootstocks were susceptible to *P. cactorum* and *Pythium* spp. isolates, as previously demonstrated by others (Yao *et al.*, 2006). Roiger and Jeffers (1991) found that *P. cactorum* was highly responsible for crown and root rot in apple trees worldwide. However, Tewoldemedhin *et al.* (2011a-b) reported that the etiological agent of root diseases is a complex of multiple fungal and Oomycete species belonging to the genera *Phytophthora*, *Pythium*, and *Rhizoctonia* (Manici *et al.*, 2013). In the present study, *P. cactorum*, *P. ultimum*, *F. sacchari* and *F. oxysporum* were the most pathogenic species. These species have previously been reported in other studies as causal agents of root rot diseases in apple trees of major importance worldwide (Uthkede and Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001).

The most pathogenic *Fusarium* isolate was *F. sacchari*, which infected 100% of the M.25, Bud.9 and G.30 trees in spite of the fact that this isolate had low consistency (7.1%) as compared to the rest

**Cuadro 3. Porcentaje de patogenicidad de aislados de Oomicetos y hongos al ser evaluados bajo condiciones de invernadero contra doce portainjertos de 1 año de edad predominantemente plantados en el estado de Chihuahua, México, después de dos meses de ser inoculados.**

**Table 3. Pathogenicity percentage of Oomycetes and fungi isolates when tested under greenhouse conditions against twelve 1-year-old rootstocks predominantly planted in the state of Chihuahua, Mexico, after two months of being inoculated.**

Hongos y Oomicetos	Portainjerto											
	G.222	M.111	G.935	M.25	Bud 118	Bud 9	G.30	M.106	G.202	G.41	M.7	Standard
<i>Pythium irregulare</i>	80	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	80
<i>Pythium ultimum</i>	-	100	-	60	-	80	100	80	100	80	80	60
<i>Pythium</i> sp.	-	80	-	-	80	60	60	-	80	100	60	-
<i>Phytophthora cactorum</i> c1	-	100	-	60	100	-	100	-	-	-	-	-
<i>Phytophthora cactorum</i> c2	-	80	-	-	80	-	80	-	-	80	-	-
<i>Phytophthora cactorum</i> c3	-	-	-	-	100	60	100	100	100	-	-	-
<i>Phytophthora cactorum</i> c4	-	60	-	-	-	80	80	-	100	80	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	60	80	80	60	100	80	-	-
<i>Alternaria brassicae</i>	-	-	-	-	-	60	80	60	-	-	-	-
<i>Fusarium sacchari</i>	60	-	-	100	-	100	100	60	60	60	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	60	60	-	60	-	-	60	-	-	60	100	-
<i>Fusarium tricinctum</i>	60	-	-	-	-	60	-	-	60	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	80	-	-	-	-	-	60	-	60	60	-	-
<i>Gibberella intermedia</i>	-	60	-	-	-	-	60	-	60	60	-	-
<i>Bionectria ochroleuca</i>	60	60	-	-	60	-	100	-	100	-	60	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Solo se consideraron patogénicos a los aislados de Oomicetos y hongos que causaron síntomas en  $\geq 60\%$  de cada uno de los portainjertos, después de dos meses de haber sido inoculados / Only Oomycetes and fungal isolates that caused  $\geq 60\%$  symptoms in each rootstock, after two months of being inoculated, were considered pathogenic.

(-) Sin síntomas / (-) Without symptoms.

plantados en las áreas productoras de manzana de Chihuahua, México. Estos portainjertos mostraron síntomas de infección a cinco aislados de Oomicetos, siendo *P. cactorum* C1 y *Pythium ultimum* los aislados más patogénicos. Estos portainjertos junto con MM.106 han sido reportados como los más susceptibles a estos patógenos (Roiger y Jeffers, 1991; Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001). Resultados similares fueron encontrados por Latorre *et al.* (2001) después de la inoculación de aislados de *Phytophthora*, siendo *P. cactorum* el más virulento y patogénico a los portainjertos M.9, M.25, MM.106 and MM.111. El portainjerto Estándar únicamente fue susceptible a dos especies de *Pythium*, *P. irregulare* y *P. ultimum* con 80 y

of the identified microorganisms. This effect of *F. sacchari* might be consequence of its low growth rate or to the presence of some antagonistic isolates coexisting in the same microenvironment (Table 3). In contrast, *F. tricinctum* and *F. solani* resulted non-pathogenic in seven rootstocks while in the rest of the *Fusarium* isolates showed low pathogenicity. Manici *et al.* (2003) also observed non-pathogenic of *Fusarium* isolates in apple trees.

*Alternaria alternata* was the most pathogenic in G.202 rootstock. Control rootstocks remained free of disease during the experiment. The main symptoms observed were malformations, gradual wilting in diseased rootstocks, defoliation, senescence, necrotic tissues, chlorosis, rigid leaves,

60%, respectivamente (Cuadro 3). Éste hallazgo es contrario a lo que se observó en los huertos evaluados, donde la más alta incidencia de daño infeccioso en raíces fue encontrado en portainjertos Estándar. Sin embargo, esto puede estar relacionado a la edad de los árboles (30-40 años), haciéndolos más susceptibles al ataque de fitopatógenos. La mayoría de los portainjertos probados fueron susceptibles a aislados de *P. cactorum* y *Pythium* spp., como fue demostrado previamente por otros (Yao *et al.*, 2006). Roiger y Jeffers (1991) encontraron que *P. cactorum* fue altamente responsable de la pudrición de corona y raíz en árboles de manzano alrededor del mundo. Sin embargo, Tewoldemedhin *et al.* (2011a-b) reportaron que el agente etiológico de las enfermedades de raíz es un complejo múltiple de especies de hongos y Oomicetos pertenecientes a los géneros *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia* (Manici *et al.*, 2013). En el presente estudio, *P. cactorum*, *P. ultimum*, *F. sacchari* y *F. oxysporum* fueron las especies más patogénicas. Estas especies han sido previamente reportadas en otros estudios como agentes causales de enfermedades de pudrición de raíz en árboles de manzano de mayor importancia alrededor del mundo (Uthkede y Smith, 1991; Latorre *et al.*, 2001).

El aislado más patogénico de *Fusarium* fue *F. sacchari*, el cual infectó 100% de los árboles M.25, Bud.9 y G.30, a pesar de que este aislado tuvo una baja consistencia (7.1%) en comparación con el resto de los microorganismos identificados. Este efecto de *F. sacchari* puede ser consecuencia de su baja tasa de crecimiento o a la presencia de algunos aislados antagonistas coexistiendo en el mismo microambiente (Cuadro 3). En contraste, *F. tricinctum* y *F. solani*, resultó ser no-patogénico en siete portainjertos mientras el resto de los aislados de *Fusarium* mostró una baja patogenicidad. Manici *et al.* (2003) también observaron aislados no-patogénicos en árboles de manzano.

leaves with dark brown round spots with concentric yellowish rings, young shots withered, root and neck rot, collapsed stems with black and oval spots, canker, discoloration of brown to reddish-brown and gummy exudates.

#### **Antagonistic activity *in vitro* of *Trichoderma* spp. vs Oomycetes**

The four species of *Trichoderma* showed similar antagonistic behavior when they were confronted against *Pythium* spp. and *P. cactorum* isolates. However, the PIRG was different for isolates of *Pythium* spp. (1.6-31.4%,  $p=0.05$ ) and *P. cactorum* (8.1-92.1%,  $p=0.05$ ). The overgrowth (total invasion over the pathogens) of the four species of *Trichoderma* was observed for all isolates of both Oomycetes after eight days post-confrontation (Table 4). Gajera and Vakharia (2010) also observed the highest growth inhibition of phytopathogenic fungi with some *Trichoderma* species. Gajera and Vakharia (2010) demonstrated that these species competed against phytopathogenic fungi and produced extracellular enzymes (i.e. chitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase, and proteases), besides of being antifungal, growth promoters, and induced the resistance of plants to pathogens. Among testes *Trichoderma* species, *T. asperellum* showed a low PIRG (15.5-31.4%,  $p=0.05$ ) in the three species of *Pythium*, with the highest inhibition being observed with *P. irregulare* at the fifth day post-confrontation. In confrontations with *P. cactorum* isolates, the PIRG was >84% ( $p=0.05$ ) at the eighth day post-confrontation (Table 4; Fig. 1a). Similarly, Rios-Velasco *et al.* (2016) also observed significant inhibition of radial growth in confrontations of *T. asperellum* against *Aspergillus nidulans* and *Penicillium crustosum*, showing the potential of this strain to be used as biological control agent of different types of phytopathogens.

*Alternaria alternata* fue el más patogénico en portainjertos G.202. Los portainjertos testigo se mantuvieron libres de enfermedades durante el experimento. Los principales síntomas observados fueron malformaciones, marchitez gradual en los portainjertos enfermos, defoliación, senescencia, tejido necrótico, clorosis, hojas rígidas, hojas con manchas redondas café oscuro con anillos concéntricos amarillos, brotes jóvenes marchitos, pudrición de cuello y raíz, tallos colapsados con manchas ovales negras, cánceres, decoloración de marrón a marrón rojizo y exudados gomosos.

#### Actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs Oomicetos

Las cuatro especies de *Trichoderma* mostraron un comportamiento antagónico similar cuando fueron confrontados contra aislados de *Pythium* spp. y *P. cactorum*. Sin embargo, el PICR fue diferente para aislados de *Pythium* spp. (1.6-31.4%,  $p=0.05$ ) y *P. cactorum* (8.1-92.1%,  $p=0.05$ ). Se observó sobrecrecimiento (invasión total sobre los patógenos) de las cuatro especies de *Trichoderma* para todos los aislados de ambos Oomicetos después de ocho días post-confrontación (Cuadro 4). Gajera y Vakharia (2010) también observaron la más alta inhibición de crecimiento de los hongos fitopatógenos con algunas especies de *Trichoderma*. Gajera y Vakharia (2010) demostraron que dichas especies compiten contra hongos fitopatógenos y producen enzimas extracelulares (ej. quitinasa,  $\beta$ -1,3 glucanasa, y proteasas), además de ser antifúngicos, promotores del crecimiento, e inducen la resistencia de las plantas a patógenos. Entre las especies de *Trichoderma* probadas, *T. asperellum* mostró un bajo PICR (15.5-31.4%,  $p=0.05$ ) en las tres especies de *Pythium*, con la inhibición más alta observada con *P. irregulare* al quinto día post-confrontación. En las confrontaciones con aislados de *P. cactorum* el

In our study, *T. harzianum* showed the same trend in PIRG as compared with *T. asperellum*; when it was confronted against *Pythium* spp., the incidence ranged from 1.6 to 7.9% ( $p=0.05$ ) but in confrontations with *P. cactorum* isolates, the incidence ranged from 86.6 to 92.1% ( $p=0.05$ ) (Table 4; Figure 1b). This difference could be attributed to the ability of *T. harzianum* to produce the antibiotic 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone and regulate genes involved in the biosynthesis of trichothecenes and mycotoxins with broad spectrum of antimicrobial activities (Cooney *et al.*, 2001). Additionally, this antagonist completely filled the Petri dish after three days.

*Trichoderma gamsii* showed values of PIRG from 15.5 to 29.7% ( $p=0.05$ ) in *Pythium* spp. isolates and >81% in *P. cactorum* isolates. These results were similar to those obtained with *T. asperellum* (Table 4). Moreover, *T. atroviride* showed the same trend, with a PIRG values from 11.8 to 26.3% ( $p=0.05$ ) in *Pythium* spp. isolates and >89% ( $p=0.05$ ) in *P. cactorum* isolates at the fifth and sixth day post-confrontation, respectively (Table 4; Figure 1c). In this study, *T. atroviride* was the best control agent for the inhibition of the growth of *P. cactorum* in PDA medium. Gajera and Vakharia (2010) also observed that *T. atroviride* was effective to reduce the incidence of collar rot, reducing pathogen virulence. Roiger and Jeffers (1991) suggested that *Trichoderma* species are promissory as biological control agents to *P. cactorum*, because its use is compatible with management practices and other root diseases, including the use of pesticides. *Trichoderma* species also showed plant growth promoter activities, suggesting another potential benefit for their use. According to Bell's scale, an antagonism Type 1 was found for the four *Trichoderma* species, where the antagonist (*Trichoderma* spp.) overgrew completely on pathogen's colony and completely

**Cuadro 4. Inhibición de crecimiento de Oomicetos, cuando se confrontaron *in vitro* contra especies de *Trichoderma* a los 8 d post-inoculación y por especies de *Bacillus* al sexto día post-inoculación.****Table 4. Growth inhibition of Oomycetes, when confronted *in vitro* against *Trichoderma* species 8 d post-inoculation and by *Bacillus* species at sixth day post-inoculation.**

Oomicetos fitopatógenos	Inhibición del patógeno (%) ± DE					
	<i>Bacillus</i>		<i>Trichoderma</i>			
	<i>methylophilicus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	<i>asperellum</i>	<i>harzianum</i>	<i>atroviride</i>	<i>gamsii</i>
<i>Phytophthora cactorum</i> c1	91.6±0.2a <sup>x</sup>	93.8±0.3a	84.2±0.4b	88.3±0.7ab	91.4±0.9a	81.4±0.7b
<i>Phytophthora cactorum</i> c2	92.3±0.3a	92.8±0.2a	84.1±1.0b	86.7±0.9b	89.0±0.5b	81.4±0.9b
<i>Phytophthora cactorum</i> c3	85.8±0.1b	85.1±0.1b	88.0±0.6a	92.1±0.7a	92.1±0.5a	86.4±0.6a
<i>Phytophthora cactorum</i> c4	88.2±0.7ab	91.4±0.6a	84.8±1.0b	90.0±0.4a	91.1±1.0a	83.5±0.9ab
<i>Pythium irregulare</i>	18.8±0.3c	47.3±1.6c	31.4±6.0c	7.9±3.5b	13.5±0.4d	29.7±5.7c
<i>Pythium ultimum</i>	1.4±0.2d	2.4±0.4e	15.5±1.8d	1.6±0.7d	11.8±0.9d	15.5±1.8e
<i>Pythium</i> sp.	14.9±0.2c	11.2±0.4d	26.5±4.9cd	3.3±1.5c	26.3±0.9c	23.4±5.0d

<sup>x</sup>Las letras en la misma columna indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra no son diferentes significativamente (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p=0.05$ ) / <sup>x</sup>Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ( $p=0.05$ ).

PICR fue >84% ( $p=0.05$ ) al octavo día post-confrontación (Cuadro 4; Figura 1a). De manera similar, Rios-Velasco *et al.* (2016) también observaron inhibiciones del crecimiento radial significativas en confrontaciones de *T. asperellum* contra *Aspergillus nidulans* y *Penicillium crustosum*, mostrando el potencial de estas cepas para ser utilizadas como agentes de control biológico de diferentes tipos de fitopatógenos. En nuestro estudio, *T. harzianum* mostró la misma tendencia en PICR al ser comparada con *T. asperellum*; cuando fue confrontada contra *Pythium* spp., la incidencia fluctuó entre 1.6 y 7.9% ( $p=0.05$ ) pero en confrontaciones con aislados de *P. cactorum*, la incidencia osciló de 86.6 a 92.1% ( $p=0.05$ ) (Cuadro 4; Figura 1b). Esta diferencia se puede atribuir a la habilidad de *T. harzianum* para producir el antibiótico 6-pentil- $\alpha$ -pirona y regular los genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos y micotoxinas con actividades antimicrobianas de amplio espectro (Cooney *et al.*, 2001). Adicionalmente, este antagonista llenó completamente la caja de Petri después de tres días.

*Trichoderma gamsii* mostró valores de PICR de 15.5 a 29.7% ( $p=0.05$ ) en aislados de *Pythium* spp.

covered medium's surface after six days post-inoculation against *Phytophthora* isolates.

#### Antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. vs Oomycetes

The bacteria *B. amyloliquefaciens* and *B. methylophilicus* inhibited the growth of *P. cactorum* isolates more than 85% ( $p=0.05$ ) when evaluated *in vitro*, and both antagonists showed PIRGs values lower than 50 and 20% ( $p=0.05$ ), respectively, when they were confronted against *Pythium* spp. *Bacillus amyloliquefaciens* showed a PIRG ranging from 85.1 to 93.8% when it was confronted against *P. cactorum* and from 2.4 to 47.6% ( $p=0.05$ ) against *Pythium* spp. at the sixth day post-confrontation. *Bacillus methylophilicus* showed the same trend, with a PIRG of 1.4 to 18.8% ( $p=0.05$ ) when it was confronted against *Pythium* spp. and a PIRG value higher than 85% ( $p=0.05$ ) in *P. cactorum* isolates (Table 4; Fig. 1 d-f). Both bacteria showed high PIRG in confrontations with *P. cactorum* isolates, reflecting probably the production of antibiotics, enzymes that attack

y >81% en aislados de *P. cactorum*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con *T. asperellum* (Cuadro 4). Por otra parte, *T. atroviride* mostró la misma tendencia con valores de PICR de 11.8 a 26.3% ( $p=0.05$ ) en aislados de *Pythium* spp. y >89% ( $p=0.05$ ) en aislados de *P. cactorum* al quinto y sexto día post-confrontación, respectivamente (Cuadro 4; Figura 1c). En este estudio, *T. atroviride* fue el mejor agente de control para la inhibición del crecimiento de *P. cactorum* en medio PDA. Gajera y Vakharia (2010) también observaron que *T. atroviride* fue efectivo en reducir la incidencia de pudrición de cuello, reduciendo la virulencia del patógeno. Roiger y Jeffers (1991) sugirieron que las especies de *Trichoderma* son promisorios agentes de control biológico a *P. cactorum*, porque su uso es compatible con prácticas de manejo y otras enfermedades de raíz, incluyendo el uso de plaguicidas. Las especies de *Trichoderma* también mostraron actividades de promoción de crecimiento vegetal, sugiriendo otro beneficio potencial para su uso. De acuerdo con la escala de Bell, se mostró un antagonismo Tipo 1 para las cuatro especies de *Trichoderma*, donde el antagonista (*Trichoderma*) sobrecreció completamente la colonia del patógeno y cubrió completamente el medio, después de seis días post-inoculación contra aislados de *Phytophthora*.

#### Actividad antagonista *in vitro* de *Bacillus* spp. vs Oomicetos

Las bacterias *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus* inhibieron el crecimiento de aislados de *P. cactorum* en más del 85% ( $p=0.05$ ) al ser evaluadas *in vitro*, y ambos antagonistas mostraron valores de PICR menores al 50 y 20% ( $p=0.05$ ), respectivamente, cuando fueron confrontados contra *Pythium* spp. *Bacillus amyloliquefaciens* mostró un PICR fluctuando de 85.1 a 93.8% cuando fue

the cell components of the pathogens or volatile compounds that inhibit the growth of the pathogen. However, a dissimilar behavior was observed when they were confronted with *Pythium* species exhibiting fast growth, and the rates of the PIRG were low compared with the *P. cactorum* isolates when confronted *in vitro* against *Bacillus* spp. (Table 4). Jeyaseelan *et al.* (2012) evaluated the antagonistic effect of some *Bacillus* species against *Pythium aphanidermatum* and also observed a low inhibition effect by some antagonistic species such as those tested in the present study, reflecting the inability of *Bacillus* species to produce highly effective antimicrobial compounds against some *Pythium* species. According to Guillén-Cruz *et al.* (2006), the *Bacillus* genus showed antagonistic effects *in vitro* against *Phytophthora* spp. with *B. amyloliquefaciens* being the most efficient and showing a plant growth promoter effect, likely contributing to the setting of macronutrients and the solubilization of phosphates and other micronutrients.

Notably, *Bacillus* species showed an inhibition halo >29 mm when it was confronted against *P. cactorum*, at 6 d post-confrontation and there was no contact day (Table 5). Some of the most important mechanisms of antagonistic bacteria such as *Bacillus* are the antibiosis, consisting on the production of antibiotic compounds and the inhibition of other microbes (Intana *et al.*, 2008). Souto *et al.* (2004) demonstrated that *B. amyloliquefaciens* exerted antifungal properties and that it might be considered as a good biological control agent. Dev-Sharma *et al.* (2013) obtained >90% inhibition in phytopathogenic fungi when they were confronted *in vitro* against *B. methylotrophicus*. Silo-Suh *et al.* (1994) reported that some *Bacillus* species have the ability to produce effective and broad-spectrum antibiotics, such as peptides, lipopeptides, aminoglycosides and

confrontado contra *P. cactorum* y de 2.4 a 47.6% ( $p=0.05$ ) contra *Pythium* spp. al sexto día post-confrontación. *Bacillus methylotrophicus* mostró la misma tendencia, con un PICR de 1.4 a 18.8% ( $p=0.05$ ) cuando fue confrontado contra *Pythium* spp. y un valor de PICR superior al 85% ( $p=0.05$ ) en aislados de *P. cactorum* (Cuadro 4; Figura 1 d-f). Ambas bacterias mostraron altos PICR en confrontaciones con aislados de *P. cactorum*, reflejando probablemente la producción de antibióticos, enzimas que atacan los componentes de las células de patógenos o compuestos volátiles que inhiben el crecimiento del patógeno. Sin embargo, se observó un comportamiento diferente cuando fueron confrontados con especies de *Pythium* exhibiendo rápido crecimiento, y los rangos de PICR fueron bajos comparados con los aislados de *P. cactorum* cuando fueron confrontados *in vitro* contra *Bacillus* spp. (Cuadro 4). Jeyaseelan *et al.* (2012) evaluaron el efecto antagonista de algunas especies de *Bacillus* contra *Pythium aphanidermatum* y también observaron un bajo efecto de inhibición por algunas especies antagonistas como las evaluadas en el presente estudio, reflejando la incapacidad de las especies de *Bacillus* para producir compuestos antimicrobianos altamente efectivos contra algunas especies de *Pythium*. De acuerdo con Guillén-Cruz *et al.* (2006), el género *Bacillus* mostró efectos antagonistas *in vitro* contra *Phytophthora* spp., siendo *B. amyloliquefaciens* el más eficiente y mostrando un efecto de promoción de crecimiento vegetal, probablemente contribuyendo a la fijación de los macronutrientes y la solubilización de fosfatos y otros micronutrientes.

Notablemente, las especies de *Bacillus* mostraron un halo de inhibición >29 mm cuando fueron confrontadas contra *P. cactorum* a los 6 d post-confrontación y no hubo día de contacto (Cuadro 5). Algunos de los mecanismos más importantes de las bacterias antagonistas como *Bacillus* son la an-

aminopolyols. Moreover, Wheatley (2002) referred to the volatile organic compounds produced by different bacteria and fungi as ideal in microbial interactions, reflecting efficacy over a wide range of spatial scales, inhibiting the growth of many pathogenic fungi, as these compounds have direct or indirect effects on the activity of specific fungal enzymes.

## CONCLUSIONS

Fungi and Oomycetes were the most abundant in collected isolates, with *Fusarium oxysporum* being the most representative species. The 1-year-old G.935, Standard and M.25 rootstocks were the most resistant to tested isolates, which could be attributed to the age and genotype of the rootstocks. Our results demonstrated that both antagonistic groups could be considered as candidates to be used as biological control agents for *P. cactorum*, which is important causal agent of root diseases in apple rootstocks. Further *in vitro* and *in vivo* studies are required to confirm the effectiveness of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates against various causal agents of root diseases in apple orchards in Chihuahua.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Fundación Produce Chihuahua, Mexico, for funding this research under project 362. Maria Fernanda Ruiz Cisneros received a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) during her Master of Science study.

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

**Cuadro 5. Halo de inhibición mostrado cuando se confrontaron *in vitro* especies de *Bacillus* contra Oomicetos a los seis días después de la inoculación.**  
**Table 5. Inhibition halo showed when confronted *in vitro* *Bacillus* species against Oomycetes at six days after inoculation.**

| Oomicetos                       | Halo de inhibición (mm) por las bacterias ± DE |                             |
|---------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                 | <i>B. methylotrophicus</i>                     | <i>B. amyloliquefaciens</i> |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c1 | 31.4±0.6a*                                     | 31.8±0.3a                   |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c2 | 31.5±0.9a                                      | 31.6±1.8a                   |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c3 | 29.5±0.7b                                      | 29.35±0.4b                  |
| <i>Phytophthora cactorum</i> c4 | 30.0±1.0ab                                     | 30.8±0.5ab                  |
| <i>Pythium irregulare</i>       | 0c                                             | 0c                          |
| <i>Pythium ultimum</i>          | 0c                                             | 0c                          |
| <i>Pythium</i> sp.              | 0c                                             | 0c                          |

\*Las letras en la misma columna indicaron diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra no son diferentes significativamente (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p=0.05$ ) / \*Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ( $p=0.05$ ).

tibiosis, consistiendo en la producción de compuestos antibióticos y la inhibición de otros microbios (Intana *et al.*, 2008). Souto *et al.* (2004) demostraron que *B. amyloliquefaciens* ejerce propiedades antifúngicas y que puede ser considerado como un buen agente de control biológico. Dev-Sharma *et al.* (2013) obtuvieron >90% de inhibición en hongos fitopatógenos cuando fueron confrontados *in vitro* contra *B. methylotrophicus*. Silo-Suh *et al.* (1994) reportaron que algunas especies de *Bacillus* tienen la habilidad de producir efectivos antibióticos de amplio espectro, tales como péptidos, lipopéptidos, aminoglicósidos y aminopolióles. Por otra parte, Wheatley (2002) se refirió a los compuestos orgánicos volátiles producidos por diferentes bacterias y hongos como ideales en las interacciones microbianas, reflejando su eficacia sobre un amplio rango de escalas espaciales, inhibiendo el crecimiento de muchos hongos patógenos, ya que estos compuestos tienen efectos directos o indirectos en la actividad de enzimas fúngicas específicas.

## CONCLUSIONES

Los hongos y Oomicetos fueron los más abundantes en los aislados recolectados, siendo *Fusarium oxysporum* la especie más representativa. Los portainjertos de 1 año de edad G.935, Estándar y M.25 fueron los más resistentes a los aislados probados, lo cual se puede atribuir a la edad y genotipo de los portainjertos. Nuestros resultados demostraron que ambos grupos antagonistas pueden ser considerados como candidatos para ser usados como agentes de control biológico para *P. cactorum*, el cual es un importante agente causal de enfermedades de raíz en portainjertos de manzano. Se requieren estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* para confirmar la efectividad de aislados de *Trichoderma* y *Bacillus* contra varios agentes causales de enfermedades de raíz en huertos de manzano en Chihuahua.



## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Produce Chihuahua, México, por el financiamiento de esta investigación bajo el proyecto 362. María Fernanda Ruiz Cisneros recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante sus estudios de Maestría en Ciencias.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Molecular Biology* 15: 403–410. [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Barnett, H.L., y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi (3rd ed.). The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 218p.
- Bell D, Well H y Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379–382. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04\\_379.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF)
- Carreri R, Raimo F, Pentangelo A y Lahoz E. 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection* 43: 31–37. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.013>
- Cooney JM, Lauren DR y di-Menna ME. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 522–526. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0006372>
- Dev-Sharma SC, Shovon MS, Sarwar-Jahan MG, Asaduzzaman AK, Rahman Md.A, Biswas KK y Roy N. 2013. Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus* SCS 2012 isolated from soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(4): 2293–2307. Disponible en línea: [http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/02/jmbfs\\_0247\\_devsharma.pdf](http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/02/jmbfs_0247_devsharma.pdf)
- Dugan FM. 2006. The Identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 176p.
- Ezziyyani M, Sánchez C, Requena ME, Rubio L y Candela ME. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69–78. Disponible en línea: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Gajera HP y Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2010.04.005>
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E y Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 105–114. Disponible en línea: <http://www.re-dalyc.org/pdf/612/61224204.pdf>
- Hantula J, Lilja A, Nuorteva H, Parikka P y Werres S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* 104(9): 1062–1068. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002999>
- Hsuan HM, Salleh B y Zakaria L. 2011. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 6722–6732. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12106722>
- Intana W, Yenjit P, Suwanno T, Sattasakulchai S, Suwanno M y Chamswarn C. 2008. Efficacy of antifungal metabolites *Bacillus* spp. for controlling tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Walailak Journal Science and Technology* 5(1): 29–38. Disponible en línea: <http://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/108/92>
- Jeyaseelan EC, Tharmila S y Niranjan K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato Damping Off. *Archives of Applied Science Research* 4(4): 1623–1627. Disponible en línea: <http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/antagonistic-activity-of-trichoderma-spp-and-bacillus-spp-against-pythium-aphanidermatum-isolated-from-tomato-damping-of.pdf>
- Ju R, Zhao Y, Li J, Jiang H, Liu P, Yang T, Bao Z, Zhou B, Zhou X y Liu X. 2014. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology* 64: 377–383. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-0672-3>
- Kamal S, Prasad R y Varma A. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals Soil Heavy Metals. Springer Berlin Heidelberg. 19:31–63. [https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436Lamichhane JR y Venturi V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. <i>Frontiers in Plant Science</i> 6(385): 1-12. <a href=)
- Latorre BA, Rioja ME y Wilcox WF. 2001. *Phytophthora* species associated with crown and root rot of apple in Chile. *Plant Disease* 85: 603–606. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.6.603>
- Leslie JF, Anderson LL, Bowden RL y Lee YW. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 119: 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059>
- Manici LM, Ciavatta C, Keledeker M y Erschbaumer G. 2003. Replant problems in South Tyrol: role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic

- apple orchards. *Plant and Soil* 256: 315–324. <http://doi.org/10.1023/A:1026103001592>
- Manici LM, Kelderer M, Franke-Whittle IH, Rühmer T, Baab G, Nicoletti F y Neaf A. 2013. Relationship between root-endophytic microbial communities and replant diseases in specialized apple growing areas in Europe. *Applied Soil Ecology* 72: 207–214. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.011>
- Pérez-Corral DA, García-González NY, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI y Rios-Velasco C. 2015. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(7): 1629–1638. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Raeder U y Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Ramírez-Legarreta MR, Jacobo-Cuéllar JL, Marioni-Ávila MR y Parra-Quezada RA. 2004. Eficiencia del uso de plaguicidas en huertos de manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 403–413. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222314.pdf>
- Ramírez-Legarreta MR, Ruiz-Corral JA, Medina-García G, Jacobo-Cuéllar JL, Parra-Quezada RA, Ávila-Marioni MR y Armando-Álvarez JP. 2011. Perspectivas del sistema de producción de manzano en Chihuahua, ante el cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 265–279. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2nspe2/v2spe2a8.pdf>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JM, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84–99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Roiger DJ, y Jeffers SN. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology* 81: 910–917. <http://doi.org/10.1094/Phyto-81-910>
- Rumberger, A., Merwin, I.A., y Thies, J.E. 2007. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.023>
- Samaniego-Gaxiola JA. 2007. Research perspectives on *Phymatotrichopsis omnivora* and the disease it causes. *Agricultura Técnica en México* 33: 309–318. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agritm/v33n3/v33n3a10.pdf>
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M y Migheli Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14(4): 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
- Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P, y Janssen PH. 2004. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 4363–4366. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4363-4366.2004>
- Serdani M, Kang JC, Andersen B y Crous PW. 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106: 561–569. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005993>
- Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J y Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2023–2030. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201597/pdf/aem00023-0329.pdf>
- Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M y García AF. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247–1256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
- Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Botha WJ, Spies CFJ y McLeod A. 2011a. Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 130: 215–229. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9747-9>
- Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Labuschagne I y McLeod A. 2011b. A multi-phasic approach reveals that apple replant disease is caused by multiple biological agents, with some agents acting synergistically. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1917–1927. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.014>
- Uthkede RS y Smith EM. 1991. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with root rot of young apple trees and their control. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 1059–1063. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90044-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90044-K)
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species (3rd ed.): CRC Press.
- Wheatley RE. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 357–364. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020592802234>
- White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Press, A. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. pp. 315–322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wilcox WF. 1993. Incidence and severity of crown and root rots on four apple rootstocks following exposure to *Phytophthora* species and waterlogging. *Journal of American Society of Horticultural Science* 118(1): 63–67. Disponible en línea: <http://journal.ashspublications.org/content/118/1/63.full.pdf+html>
- Yao S, Merwin I A, Abawi GS y Thies JE. 2006. Soil fumigation and compost amendment alter oil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 587–599. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.026>