First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico

Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México

Fannie Isela Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, INIFAP, Norman E. Borlaug Km 12, C.P.85000, Ciudad Obregón, Sonora, México, **Jesús García Pereyra, Gabriel Nicolás Aviña Martínez,** Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Carretera Durango - México Km 22.5, C.P. 34371, Ejido Villa Montemorelos, Durango, **Sergio de los Santos-Villalobos*,** CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P.85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. *Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Recibido: 13 de Octubre, 2018. **Aceptado**: 22 de Diciembre, 2018.

Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN and de los Santos-Villalobos S. 2019. First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 193-201.
DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-3

Primera publicación DOI: 30 de Diciembre, 2018.
First DOI publication: December 30, 2018.

Resumen. Muerte de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. "Valencia" fue observada en el Valle del Yaqui, México, en agosto de 2017. Para identificar el agente causal, se recolectaron hojas, ramas y raíces de árboles sintomáticos. Siete aislados fúngicos fueron obtenidos de raíces presentando oscurecimiento del sistema vascular, llamados FS1 a FS7. Las características macro y microscópicas típicas

Abstract. Death of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. "Valencia" was observed in the Yaqui Valley, Mexico, in August 2017. In order to identify the causal agent, leaves, branches, and roots from symptomatic trees were collected. Seven fungal isolates were obtained from brown roots, encoded FS1 to FS7. Macro and microscopic characteristics typical of the genus *Fusarium* were observed in all obtained single-spored isolates, such as: abundant white cottony mycelium and a purple or yellow undersurface on PDA, curved macroconidia widest in the middle of their length, and oval, reniform, elongated oval to obovoid with a truncate base, and septated microconidia. The sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region showed high coverage and similarity (>99%) to sequences of the *Fusarium solani* species complex (FSSC). The inoculation of 1-year-old orange trees with each obtained *Fusarium* isolate

del género *Fusarium* fueron observadas en todos los aislados mono-espóricos obtenidos, tales como: abundante micelio algodonoso de color blanco y un anverso de color púrpura o amarillo en PDA, macroconidias curvas más ancha en la parte central de su longitud, y ovaladas, reniformes, alargadas, de ovaladas a obovoides con una base truncada, y microconidias septadas. La secuenciación de la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS) mostró una alta cobertura y similitud (> 99%) con secuencias del Complejo de Especies de *Fusarium solani* (CEFS). La inoculación de naranjos de 1 año de edad con cada uno de los aislados de *Fusarium* obtenidos provocó el oscurecimiento del sistema vascular de la raíz y la muerte de estos árboles, lo que confirma que estos aislado fueron los agentes causales del marchitamiento por *Fusarium* observados en árboles de naranja en campos comerciales del Valle del Yaqui. Este es el primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en cítricos en dicha región.

Palabras clave: Hongo, Postulados de Koch, ITS.

La producción de cítricos en México ha aumentado, al ser este cultivo frutal el de mayor valor en el mercado internacional (http://www.fao.org) debido a su uso en la producción de jugos, mermeladas y otros. Sin embargo, las enfermedades de cítricos, en particular aquellas causadas por hongos, causan pérdidas económicas en todo el mundo y, en algunos casos, pueden reducir la producción total hasta en 50% (Ochoa *et al*., 2007). En agosto de 2017 se observaron síntomas tales como clorosis, necrosis, desecamiento, caída prematura de hojas, marchitez, y luego muerte (~ 60 ha y^{-1}) de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. "Valencia" en huertos comerciales de naranjo en el Valle del Yaqui, Sonora (26° 45'-27° 33'N latitud y 109° 30'-110° 37'W

caused browning of the root vascular system and death of these trees, confirming that those isolates were the causal agents of *Fusarium* wilt observed in orange tress in commercial fields in the Yaqui Valley. This is the first report of *Fusarium* wilt on citrus in that region.

Key words: Fungi, Koch's postulates, ITS.

The citrus production in Mexico has increased as this crop is the highest value fruit crop in the international trade (http://www.fao.org), due to its use in the production of juice, marmalade, among others. However, citrus diseases, particularly those caused by fungi, cause economic losses throughout the world, and in some cases can reduce total production by 50% (Ochoa *et al*., 2007). In August 2017, symptoms such as chlorosis, necrosis, dieback, premature leaf drop, wilting, and then death (~ 60 ha y^{-1}) of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. "Valencia" were observed in orange commercial fields in the Yaqui Valley, Sonora (26° 45'-27° 33' N latitude and 109° 30'-110° 37' W longitude), one of the most important agricultural regions in Mexico (Figure 1A). Then, leaves, branches, and roots from ten symptomatic orange trees were collected and placed into moist chambers at 4 °C for their transportation to laboratory, in order to identify the biological casual agents of those symptoms. The visual analysis of collected samples showed browning of the root vascular system (Figure 1B). Thus, fifty pieces of brown roots were surface sterilized using 1% sodium hypochlorite for 2 min, washed twice using sterile (121 °C and 15 psi for 15 min) distilled water, and cut into 1 cm pieces. Later, these root pieces were placed on Potato Dextrose Agar (PDA) (supplemented with 80 µg mL^{-1} nalidixic acid), and incubated for 5 days at 28±2 °C (12 h of darkness

longitud), una de las regiones agrícolas más importantes de México (Figura 1A). Así, se recolectaron hojas, ramas y raíces de diez naranjos sintomáticos y fueron colocados en cámaras húmedas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio, donde se identificó el agente biológico causal de dichos síntomas. El análisis visual de las muestras colectadas indicó la presencia de oscurecimiento (tonos de color café) en el sistema vascular de las raíces de dichos árboles (Figura 1B). Por ello, se esterilizaron cincuenta segmentos de dichas raíces usando una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, lavadas dos veces usando agua destilada (121 °C y 15 psi por 15 min), y se cortaron en pedazos de 1 cm. Más adelante, los pedazos de raíces fueron colocados en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (complementado con 80 µg mL^{-1} de ácido nalidíxico), e incubadas por 5 días a 28±2 °C (12 h de oscuridad y 12 h de luz) (Villa-Rodriguez *et al*., 2016). Después del periodo de incubación, cada colonia fúngica fue aislada usando el medio y las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, con lo cual se obtuvieron siete aislados fúngicos, a los que se les dieron claves FS1 a FS7. Estos aislados fueron depositados en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos- COLMENA (www.itson.edu.mx/colmena) (de los Santos-Villalobos *et al*., 2018).

Se observaron características macro y microscópicas (se produjeron preparaciones semipermanentes en ácido láctico y examinadas con un microscopio óptico) típicas del género *Fusarium* para los siete aislados obtenidos de cultivos mono-espóricos (Leslie y Summerell, 2006), *i.e.* 1) abundante micelio algodonoso y un color morado o amarillo debajo de la superficie en PDA, 2) macroconidios curveados con un mayor ancho a la mitad de su largo, y 3) microconidios septados ovalados, reniformes, ovalados alargados a obovoides con una base truncada (Figura 2). La identificación

and 12 h of light) (Villa-Rodriguez *et al*., 2016). After the incubation period, each mycelial colony was isolated using the culture medium and growth conditions mentioned above, obtaining seven fungal isolates, which were encoded FS1 to FS7. These isolates were deposited in Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos-COLMENA (www.itson.edu.mx/colmena) (de los Santos-Villalobos *et al*., 2018).

Macro and microscopic characteristics (semipermanent preparations in lactic acid were made and examined with an light microscope) typical of the genus *Fusarium* were observed for the seven obtained single-spored isolates (Leslie and Summerell, 2006), *i.e.* 1) abundant white cottony mycelium and a purple or yellow undersurface on PDA, 2) curved macroconidia widest in the middle of their length, and 3) oval, reniform, elongated oval to obovoid with a truncate base, and septated microconidia (Figure 2). The molecular identification –at genus level- of these isolates was carried out by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) region. Firstly, 1 x 10^6 spores of each fungal isolate was separately inoculated in tubes containing 5 mL of Potato Dextrose Broth (PDB), and incubated for 3 days at 28 °C (24 h of darkness). At the end of the incubation period, cell suspension was centrifuged for 5 min at 2,500 Relative Centrifugal Force (RCF) to obtain fungal mycelium. The fungal genomic DNA was extracted from 500 mg of fresh mycelium, which was re-suspended in 500 µL extraction buffer (200 mmol Tris HCl pH 8.5, 250 mmol NaCl, 25 mmol EDTA, and 0.5% SDS) by stirring with a pipette tip. The slurry was mixed homogeneously with 350 µL phenol. Then, 150 µL chloroform were added and mixed, and the suspension was centrifuged for 1 h in an Eppendorf centrifuge (13,000 RCF). The upper aqueous phase was transferred into a sterile Eppendorf tube and mixed

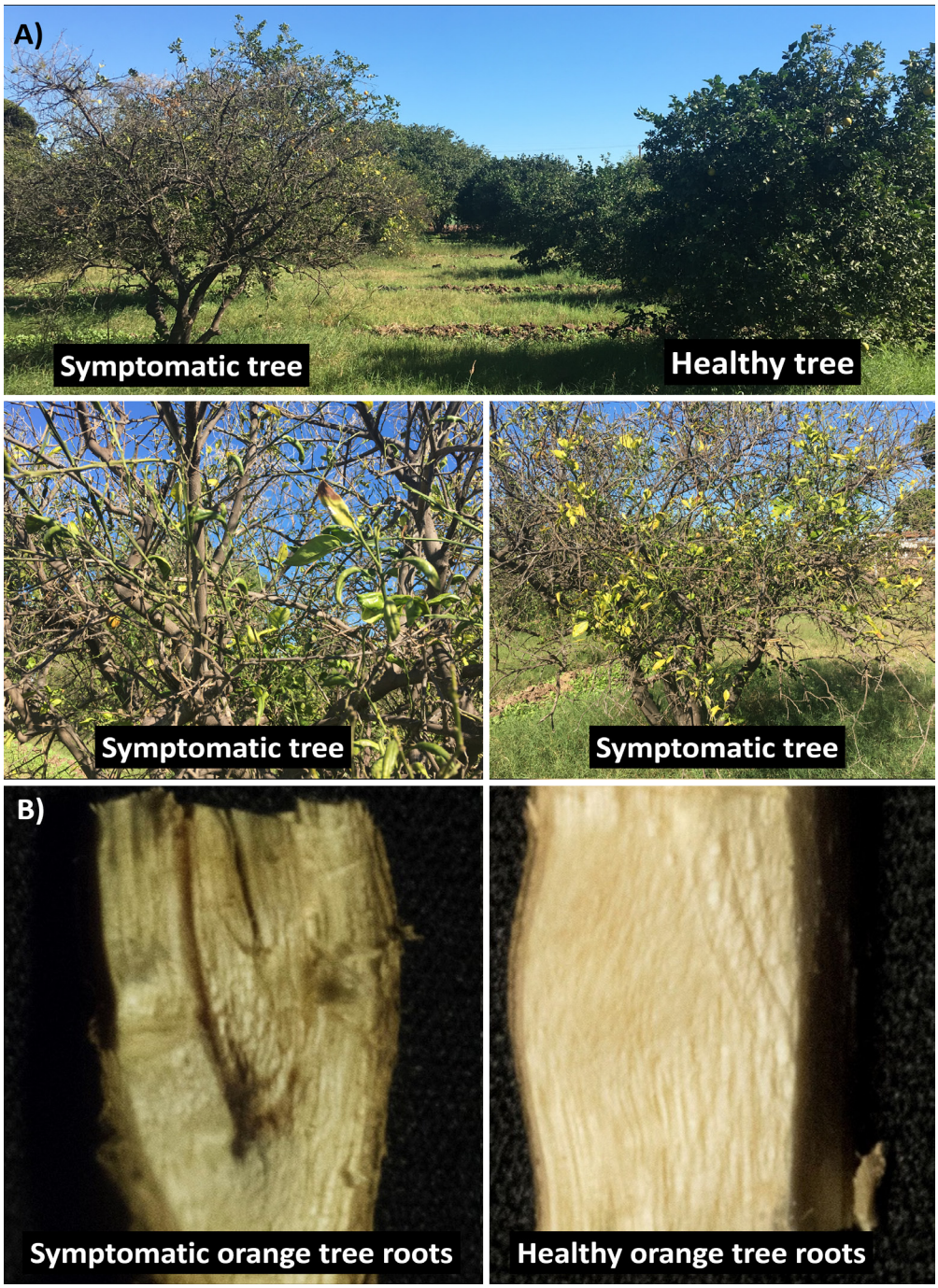

Figura 1. **Síntomas de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. Valencia" en el Valle del Yaqui, Sonora. A) Síntomas incluyen: clorosis, necrosis, desecamiento, caída prematura de hojas, marchitez y luego muerte *vs*. un árbol sano. B) Naranjo sintomático presentando tonos de color café en el sistema vascular de las raíces *vs*. raíz sana.**

Figure 1. **Symptoms of orange trees (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. Valencia" in commercial fields in the Yaqui Valley, Sonora. A) Symptoms include: chlorosis, necrosis, dieback, premature leaf drop, and wilting *vs*. a healthy tree. B) Symptomatic orange tree root showing browning of the root vascular system *vs*. healthy root.**

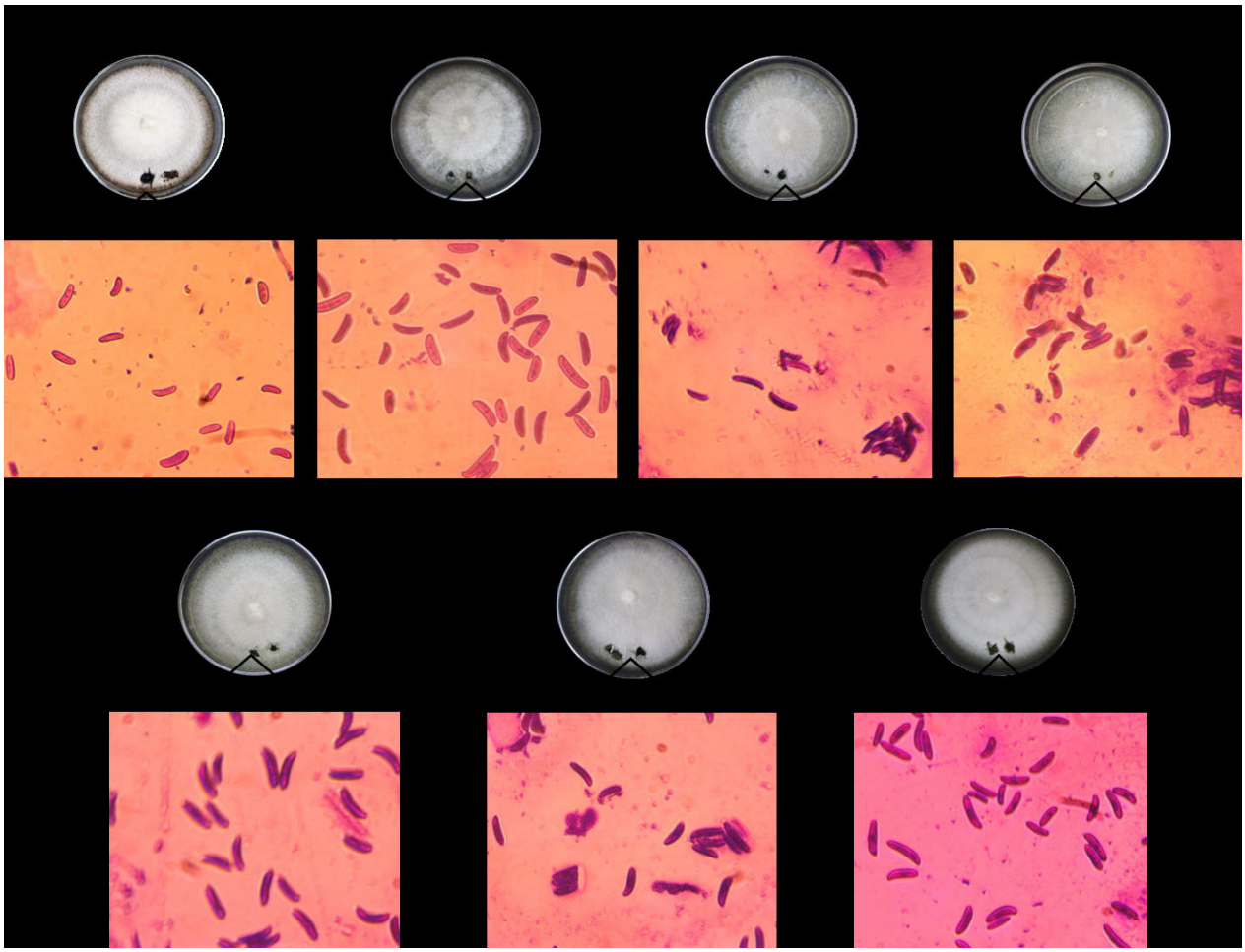

Figura 2. Caracterización morfológica de agentes asociados aislados de raíces sintomáticas. Características macroscópicas, abundante micelio algodonoso de color blanco y un anverso de color púrpura o amarillo en PDA. Características microscópicas, macroconidios curveados, de mayor ancho a mitad de su longitud.

Figure 2. Morphological characterization of associated agents isolated from symptomatic roots. Macroscopic characteristics, abundant white cottony mycelium and a dark-purple undersurface on PDA. Microscopic characteristics, curved macroconidia widest in the middle of their length.

molecular –a nivel de género – de estos aislados se realizó secuenciando la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS). Primeramente, 1 x 10^6 esporas de cada aislado fúngico fueron inoculadas de manera separada en tubos con 5 mL de Caldo de Papa y Dextrosa (CPD), e incubados por 3 días a 28 °C, (en oscuridad). Al final del periodo de incubación, la suspensión celular fue centrifugada por 5 min a 2,500 de Fuerza Centrífuga Relativa (FCR) with about 0.54 volume isopropanol (250 µL), and centrifuged for 5 min in an Eppendorf centrifuge (13,000 RCF) for DNA precipitation (Valenzuela-Aragon *et al*., 2018). The obtained DNA was dried at room temperature and re-suspended in 30 µL Nuclease-Free Water (sterile). Then, the 50 µL PCR mixture contained 100 ng fungal genomic DNA as template, 0.2 µmol of each pair of primers [ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´)

para obtener micelios fúngicos. El ADN genómico fúngico fue extraído de 500 mg de micelio fresco, el cual fue resuspendido con una pipeta en 500 µL de una solución amortiguadora de extracción (200 mmol Tris HCl pH 8.5, 250 mmol NaCl, 25 mmol EDTA, y 0.5% SDS). La solución acuosa resultante fue mezclada de forma homogénea con 350 µL de fenol. Posteriormente, se agregaron y mezclaron 150 µL de cloroformo, y la suspensión fue centrifugada por 1 h en una centrífuga Eppendorf (13,000 RCF). La fase superior acuosa fue transferida a un tubo Eppendorf esterilizado y mezclado con alrededor de 0.54 volúmenes de isopropanol (250 µL), y centrifugada por 5 min en una centrífuga Eppendorf (13,000 RCF) para la precipitación de ADN (Valenzuela-Aragon *et al*., 2018). El ADN obtenido fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 30 µL de agua libre de nucleasas (esterilizada). Luego, la mezcla de 50 µL de PCR contuvo 100 ng de ADN genómico fúngico, 0.2 µmol de cada par de oligonucleótidos [ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990)], y 4 U *MyTaq* polimerasa (Bioline). Las condiciones de PCR para la amplificación de la región de ITS consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C (3 min), 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C (30 s), seguido de un alineamiento a 55 °C (30 s), y extensión a 72 °C (1 min), así como un paso final de extensión a 72 °C (10 min) (de los Santos-Villalobos *et al*., 2013). Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa/TAE (2%), y purificados usando ISOLATE II PCR y Gel Kit (Bioline), y luego fueron secuenciados usando la plataforma Sanger (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) de Genomic Services Laboratory (LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato, Mexico). Las secuencias de ADN obtenidas fueron editadas y analizadas usando el software FinchTV 1.4.0 by Geospiza, Seattle, WA; y BLAST (NCBI, www.

and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990)], and 4 U *MyTaq* DNA polymerase (Bioline). The PCR conditions for the amplification of ITS region consisted of an initial denaturation step at 94 °C (3 min), 35 cycles of denaturation at 94 °C (30 s), followed by annealing at 55 °C (30 s), and extension at 72 °C (1 min), and a final step at 72 °C (10 min) (de los Santos-Villalobos *et al*., 2013). The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose/TAE gel (2%), and purified using ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline), and then sequenced using Sanger platform (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) by Genomic Services Laboratory (LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato, Mexico). The obtained DNA sequences were edited and analyzed using the software FinchTV 1.4.0 by Geospiza, Seattle, WA; and BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), respectively. The obtained ITS sequences showed high coverage (>99%) and similarity (>99%) to *Fusarium solani* species complex (FSSC), which is a group currently estimated to contain at least 60 phylogenetically distinct species (Coleman, 2016). Thus, based on the ITS molecular identification, all seven studied isolates were affiliated to the genus *Fusarium*, where additional and more robust molecular phylogenetic relationships need to be carried out in order to classify those isolates at specie level. The obtained *Fusarium* sequences were deposited in the NCBI Genbank as: FS1 (MG262553), FS2 (MG262554), FS3 (MG262555), FS4 (MG262556), FS5 (MG262557), FS6 (MG262558), and FS7 (MG262559).

Pathogenicity assays were conducted separately for each studied *Fusarium* isolate under greenhouse conditions (13 h of darkness at 14 °C, 2 h of light at 18 °C, 7 h of light at 25 °C, and 2 h of light at 18 °C; and 80% of relative humidity). Thus, five 1-year-old orange trees var. "Valencia" having damaged (small cuts were made using a sterile scalpel)

ncbi.nlm.nih.gov), respectivamente. Las secuencias de ITS obtenidas presentaron una alta cobertura (> 99%) y similitud (> 99%) con el complejo de especies de *Fusarium solani* (CEFS), el cual es un grupo que en la actualidad se estima que contiene al menos 60 especies filogenéticamente diferentes (Coleman, 2016). Por ende, con base en la identificación molecular de ITS, los siete aislados estudiados pertenecen al género *Fusarium*, sin embargo más y más robustas relaciones filogenéticas deben ser desarrolladas para clasificar estos aislados a nivel de especie. Las secuencias obtenidas de *Fusarium* fueron depositadas en el Genbank de NCBI como: FS1 (MG262553), FS2 (MG262554), FS3 (MG262555), FS4 (MG262556), FS5 (MG262557), FS6 (MG262558), y FS7 (MG262559).

Se llevaron a cabo ensayos de patogenicidad de forma separada para cada aislado estudiado de *Fusarium* bajo condiciones de invernadero (13 h de oscuridad a 14 °C, 2 h de luz a 18 °C, 7 h de luz a 25 °C, y 2 h de luz a 18 °C; y 80% de humedad relativa). Así, cinco naranjos de un año de edad de la var. "Valencia" con raíces dañadas (se realizaron pequeñas incisiones con un bisturí estéril) fueron inoculados con una suspensión conidial ($1x10^4$ conidios mL^{-1} y 50 mL $planta^{-1}$); se estableció un control negativo con agua destilada estéril rociada sobre la herida de la planta. Después de 30 días, se observó una coloración café en el sistema vascular de las raíces en 100% de los árboles inoculados (las plantas control fueron asintomáticas y no se recuperó ningún cultivo de *Fusarium*), causando la muerte de los mismos, de donde se recuperó cada aislado de *Fusarium* y se caracterizó como se describe anteriormente, confirmando 1) la alta virulencia de estos aislados , y 2) su papel como agente causal de los síntomas y la muerte de naranjos observados en huertos comerciales en el Valle del Yaqui.

Con base en observaciones morfológicas, la caracterización molecular parcial y el cumplimiento

roots were inoculated with a conidial suspension ($1x10^4$ conidia mL^{-1} and 50 mL $plant^{-1}$), a negative control with sterile distilled water sprayed on the plant wound. After 30 days, browning of the root vascular system of 100% of inoculated trees was observed (control plants were asymptomatic and no *Fusarium* colony was recovered), causing death of them, from which each *Fusarium* isolate was recovered and characterized as described above, confirming 1) the high virulence of those isolates, and 2) their role as the causal agents of the observed symptoms and death of orange trees in commercial fields in the Yaqui Valley.

Based on morphological observations, partial molecular characterization, and the fulfilment of Koch's postulates, we identified that studied isolates (belonging to the FSSC) were the causal agent of wilt on orange trees var. "Valencia" in the Yaqui Valley. Similar findings have been reported in California (United States), identifying to *Fusarium solani* and *Phytopstora* spp. as the causal agent of dark decay in the bark of large scaffold roots and the lower crown of the trunk, and chlorosis in leaves, and wilting on lemon and orange trees (Adesemoye *et al*., 2011). In addition, Fogliata *et al*. (2013) reported the presence of *Fusarium* rot on lemon trees, identifying *Fusarium oxysporum* as the causal agent. Recently, Sandoval-Denis *et al*. (2018) established the *Fusarium* diversity associated to citrus trees in Europe, by using morphological and molecular multi-locus analysis. The most commonly isolated species were *F. sarcochroum, F. oxysporum* and *Fusarium solani*. They also proposed a new fully-supported lineage, phylogenetically and morphologically divergent, which is named *F. citricola* species complex (FCCSC).

Although the citrus wilt had been observed previously in Mexico, there are only two cases reported in the US National Fungus Collection

de los postulados de Koch, pudimos identificar que los aislados estudiados (pertenecientes al CEFS) fueron el agente causal del marchitamiento en naranjos var. "Valencia" en el Valle del Yaqui. Hallazgos similares han sido reportados en California (Estados Unidos), identificando a *Fusarium solani* y *Phytopstora* spp. como los agentes causales de la descomposición oscura en la corteza de las raíces y la corona inferior del tronco, así como clorosis en hojas y marchitamiento en naranjos y limoneros (Adesemoye *et al*., 2011). Además, Fogliata *et al*. (2013) reportaron la presencia de pudrición por *Fusarium* en limoneros, e identificaron a *Fusarium oxysporum* como el agente causal. Recientemente, Sandoval-Denis *et al*. (2018) establecieron la diversidad de *Fusarium* relacionada a árboles de cítricos en Europa, al usar el análisis morfológico y molecular. Las especies más comúnmente aisladas fueron *F. sarcochroum, F. oxysporum* y *Fusarium solani*; también propusieron un nuevo linaje totalmente apoyado, divergente filogenéticamente y morfológicamente, que se llama complejo de especie *F. citricola* (CEFC).

Si bien el marchitamiento había sido observado previamente en México, existen sólo dos casos reportados en la Colección Nacional de Hongos de EE.UU. (https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/). Por ello, hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de marchitez por *Fusarium* en naranjos del Valle del Yaqui, causando un oscurecimiento en el sistema vascular de raíces y la muerte de árboles (~ 60 ha y^{-1}). Como *Fusarium* es un fitopatógeno virulento, es posible que el uso intensivo del arado para desagregar suelo arcilloso compactado en los huertos comerciales de naranjos en el Valle del Yaqui haya dañado el sistema de raíces de los árboles, lo cual, en combinación con condiciones del suelo y climáticas (temperatura y humedad) fue una de las fuerzas impulsoras para el brote de marchitamiento por *Fusarium*.

(https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/). Thus, to our knowledge, this is the first report of *Fusarium* wilt on the orange trees in the Yaqui Valley, causing browning of the root vascular system and death of trees (~ 60 ha y^{-1}). Since *Fusarium* is a virulent phytopathogen, probably the intensive use of tillage in order to disaggregate compacted clayed soil in the Yaqui Valley´s orange commercial fields damaged the orange trees root system, which in combination with soil and climatic (temperature and humidity) conditions, was the major driving forces for the *Fusarium* wilt outbreak.

Acknowledgements

The authors acknowledge support by Technological Institute of Sonora (ITSON) through Project PROFAPI 2018_0012. In addition, we express our thanks to Luis Abraham Chaparro, Bernardo Flores, and Levi Flores for molecular and microbiological support.

End of the English version

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) a través del Proyecto PROFAPI 2018_0012. Además, quisiéramos agradecer a Luis Abraham Chaparro, Bernardo Flores y Levi Flores por el apoyo a nivel molecular y microbiológico, respectivamente.

LITERATURA CITADA

Adesemoye A, Eskalen A, Faber B, O'Connell N. 2011. Current knowledge on *Fusarium* dry root rot of citrus. Citrograph 2(7):29-33. http://www.citrusresearch.org/citrograph/nov-dec_citrograph/#more-3226

Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. Mol Plant Pathol 17(2):146-58. https://10.1111/mpp.12289.

de los Santos-Villalobos S, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Peña-Cabriales JJ. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels,

Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control 64(1):37–44. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.006

de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragon B, Estrada-Mora JC. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9: 191–202. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858

Fogliata GM, Martínez CV, Acosta ME, Muñoz ML, Ploper LD. 2013. First report of Fusarium rot caused by *Fusarium oxysporum* on lemon in Tucumán, Argentina. Plant Disease. 97(7):989. https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-12-0069-PDN

Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Hoboken. https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198

Ochoa JL, Hernández-Montiel LG, Latisnere-Barragán H, León de La Luz JL, Larralde-Corona CP. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. Ciencia y Tecnologia Alimentaria, 5(5): 352-359. http://www.redalyc.org/html/724/72450505/

Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW. 2018. Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia. 40:1-25. https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.01

Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de los Santos-Villalobos S. 2018. Plant-assisted selection: a promising alternative for *in vivo* identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. Durum) growth promoting bacteria. Plant and Soil. In press. https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1

Villa-Rodríguez E, Lugo-Enríquez C, de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Figueroa López P. 2016. First report of C*ochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in the Yaqui valley, México. Plant Disease, 100(11): 2329. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. 315–322.