

Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*

Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*

Viridiana López-Bautista, Gustavo Mora-Aguilera* ¹Programa de Fitosanidad-Fitopatología; María Alejandra Gutiérrez-Espinosa, ²Programa de Postgrado en Fruticultura; Coral Mendoza-Ramos, Verónica Inés Martínez-Bustamante, Juan José Coria-Contreras, Gerardo Acevedo-Sánchez, Baldemar Santana-Peñaloza ³Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF). ^{1,2,3}Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230 *Autor para correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: 14 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 20 de Diciembre, 2019.

López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-4

Primera publicación DOI: 29 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 29, 2019.

Resumen. La marchitez y pudrición seca del cogollo del agave (*Agave tequilana* var. azul) son enfermedades de alto impacto económico para este cultivo. En este trabajo se planteó determinar la implicación de *Fusarium* spp. en ambas enfermedades bajo un enfoque regional. Se colectaron muestras

Abstract. Wilt and dry bud rot of the agave (*Agave tequilana* var. azul) are diseases of high economic impact for this crop. The implication of *Fusarium* spp. in both diseases at a regional context was determined in this research. Root and soil samples were collected from 40 commercial plantations located in 13 counties at Los Altos, Jalisco an important cultivation region of agave azul in Mexico; Inoculum charge, as a *Fusarium* Index was obtained base on colony units (*Fusarium* vs total fungi) and its relationship with pH and organic matter were estimated from each sampling plantation. A total of 109 isolates were morphologically characterized as *Fusarium* spp. of which 25 were selected for molecular identification with ITS and EF-1a. The selection considered symptomatology, macro and microscopic characters and prevalence of colony types observed *in vitro* in Komada, Sabouraud, SNA and CLA media. The cultural and

de raíz y suelo en 40 plantaciones comerciales ubicadas en 13 municipios de Los Altos Jalisco, importante región de cultivo de agave azul en México. De cada plantación de colecta se estimó carga de inóculo mediante un índice de *Fusarium* obtenido de unidades formadoras de colonias (*Fusarium* vs hongos totales) y se analizó su relación con pH y materia orgánica. Se obtuvieron 109 aislados caracterizados morfológicamente como *Fusarium* spp. de los cuales se seleccionaron 25 para identificación molecular con ITS y EF-1a. La selección consideró sintomatología, caracteres macro y microscópicos y prevalencia de tipologías de colonia observadas *in vitro* en medios Komada, Sabouraud, SNA y CLA. Los caracteres culturales y morfológicos evaluados fueron: coloración micelial, tamaño, forma y septación de macro y microconidios, y longitud y número de filídes. Se asociaron cinco especies con marchitez y/o pudrición seca ubicadas en tres complejos filogenéticos: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) con 56% (46.2% suelo y 66.7% raíz) de representatividad regional; *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium solani* (FSSC) (40%); y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (4%). MO y pH tuvieron correlación inversamente proporcional con Índice de *Fusarium* ($r^2 = 0.68-0.70$). Se postula que la marchitez y pudrición seca del cogollo de agave azul constituyen un síndrome en el cual se asocian y especializan parasíticamente diversas especies de *Fusarium*. Se encontró un aislado de los tres complejos de *Fusarium* asociados específicamente a cada tipo de síntoma y la combinación de ellos. La mayoría se asociaron a marchitez con predominancia de *F. oxysporum*.

Palabras clave: Agave azul, suelo, raíz, prevalencia, EF-1a.

morphological characters evaluated were mycelial coloration, size, shape and septation of macro and microconidia, and length and number of phialides. Five species were associated with wilt and/or dry bud rot within three phylogenetic complexes: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) with 56% (46.2 % soil y 66.7 % root) regional representation; *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of *Fusarium solani* complex (FSSC) (40%); and *Fusarium* sp. of *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) (4%). MO and pH correlated inversely with *Fusarium* Index ($r^2=0.68-0.70$). It is postulated that wilt and dry bud rot of blue agave constitute a syndrome in which several *Fusarium* species are associated and parasitically specialized. A single isolate per each species complex was found associated specifically to each or both symptoms. Most isolates were associated to wilting with prevalence of *F. oxysporum*.

Key words: Blue agave, soil, root, prevalence, EF-1a.

Mexico holds the Tequila Designation of Origin (DOT) since 1997, consisting of 181 counties distributed in the states of Nayarit (8), Guanajuato (7), Tamaulipas (11), Michoacán (30) and Jalisco with 125, of which 21 are at Los Altos region (CRT, 2017). In 2018, the primary production of blue agave (*Agave tequilana* var. azul) as prime product for tequila processing involved 64,582.76 has equivalent to 206.6 million plants, with 57% of the production concentrated at Los Altos (SIAP, 2018).

In the last 20 years blue agave production has been primarily affected by wilting and dry bud rot (Rubio, 2007; Gómez-Ortiz *et al.*, 2011). Vascular wilt begins with curled tip leaved due to obstruction and plugging of vascular bundles that cause

México ostenta la Denominación de Origen del Tequila (DOT) desde 1997, conformada por 181 municipios distribuidos en los estados de Nayarit (8), Guanajuato (7), Tamaulipas (11), Michoacán (30) y Jalisco con 125 municipios, de los cuales 21 se encuentran en la región de Los Altos (CRT, 2017). En 2018, la producción primaria de agave azul (*Agave tequilana* var. azul) como materia prima para elaboración de tequila implicó 64,582.76 ha equivalente a 206.6 millones de plantas, concentrándose en Los Altos el 57% de la producción (SIAP, 2018).

En los últimos 20 años, la producción de agave azul ha sido afectada primariamente por marchitez y pudrición seca del cogollo (Rubio, 2007; Gómez-Ortiz *et al.*, 2011). La marchitez vascular inicia con enrollamiento de punta de hojas por obstrucción y taponamiento de haces vasculares que provocan deshidratación y muerte progresiva de tejidos, seguido de cambio de coloración de azul turquesa a verde opaco; en etapa avanzada de enfermedad, las plantas muestran enrollamiento foliar firme, y eventualmente coriáceo, mayor al 50% del área foliar; en la mayoría de casos se pierde anclaje por reducción o destrucción total del sistema raíz (Jiménez-González *et al.*, 2017). Etiológicamente se ha reportado la asociación de diversos organismos entre ellos, *F. oxysporum* y *F. solani* (Rubio, 2007; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). En contraparte, plantas con pudrición seca del cogollo se caracterizan por lesiones corrugadas de color negro y amarillo-pálido que descienden desde la punta a base del cogollo. Inicialmente, la pudrición se restringe al ápice interno del cogollo. A diferencia de mancha gris por *Cercospora* (Coria-Contreras *et al.*, 2019) o pudrición blanda, el cogollo mantiene su textura rígida, sin colapso, y no presenta olor fétido. El agente causal de pudrición seca también se ha asociado a *Fusarium* sp. (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011), mientras que

dehydration and progressive tissue death, followed by a change in color from turquoise to opaque green. In advanced disease stages, plants show firm leaf curl, and eventually coriaceous, greater than 50% of the foliage area. In most cases, anchorage is lost due to reduction or total destruction of the root system (Jiménez-González *et al.*, 2017). Etiologically, the association of various organisms, among them; *F. oxysporum* and *F. solani* (Rubio, 2007; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) has been reported. In contrast, plants with dry bud rot are characterized by corrugated lesions of black and yellow-pale color that descend from tip to base of the bud. Initially, rot is restricted to the inner apex of the bud. Unlike gray spot by *Cercospora* (Coria-Contreras *et al.*, 2019) or soft rot, the bud maintains its rigid texture, without collapse, and has no foul odor. The causal agent of dry rot has also been associated with *Fusarium* sp. (Gómez-Ortiz, 2011), whereas in soft rot it has been associated to *Pectobacterium* spp. and *Erwinia* sp. (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). Of the three types of bud rot, the dry one has a higher occurrence although lesser than that of wilting (www.sivea.org.mx). In some subregions and farms with high wilt intensity, dry rot can occur in the same plant. Although the official phytosanitary campaign of agave was established in 2013 these diseases repeatedly implicate production inventories due to the absence of effective management methods and abandonment of commercial plantations infested during low-price cyclical periods.

Although classical morphological characterization is important to identify *Fusarium* spp. (Leslie and Summerell, 2006; Ceja-Torres *et al.*, 2008), increase in diseases and epidemics caused by this genus and its taxonomic complexity justifies the use of molecular techniques for species identification, population structure and phylogeny

en pudrición blanda se ha reportado a *Pectobacterium* spp. y *Erwinia* sp. (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). De los tres tipos de pudrición de cogollo, la seca tiene mayor ocurrencia aunque menor a marchitez (www.sivea.org.mx). En algunas subregiones y predios con alta intensidad de marchitez, la pudrición seca puede concurrir en la misma planta. Aunque en 2013 se estableció la campaña oficial fitosanitaria del agave, recurrentemente estas enfermedades comprometen inventarios productivos debido a la ausencia de métodos efectivos de manejo y por abandono de plantaciones comerciales infestadas durante periodos cíclicos de bajo precio.

Aunque la caracterización morfológica clásica es importante para identificar *Fusarium* spp. (Leslie y Summerell, 2006; Ceja-Torres *et al.*, 2008), el incremento de enfermedades y epidemias causadas por este género y su complejidad taxonómica justifica el empleo de técnicas moleculares para identificación de especies, estructura poblacional y filogenia (Liew *et al.*, 2016; Herrera-Parra *et al.*, 2017; Parra-Cota *et al.*, 2018; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2018). Convencionalmente, la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosómico nuclear se ha empleado en *Fusarium* y hongos en general (O'Donnell *et al.*, 2015). Sin embargo, es consenso actual que *Fusarium* se debe analizar con genes asociados al factor de elongación (EF-1a), a la subunidad mayor de ARN polimerasa I (RPB1), y segunda subunidad más grande de ARN polimerasa II (RPB2) (O'Donnell *et al.*, 2015). La presente investigación tuvo como objetivo identificar las especies de *Fusarium* obtenidas de raíz y suelo de plantaciones comerciales de agave azul asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo en Los Altos, Jalisco, mediante técnicas morfológicas, epidemiológicas y moleculares con la finalidad de conocer la diversidad y prevalencia regional que coadyuve al establecimiento de estrategias metodológicas, operativas y de manejo que sustenten

(Liew *et al.*, 2016; Herrera-Parra *et al.*, 2017; Parra-Cota *et al.*, 2018; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2018). Conventionally, the internal transcribed spacer region (STI) of nuclear ribosomal DNA has been used in *Fusarium* and fungi in general (O'Donnell *et al.*, 2015). However, the current consensus on *Fusarium* is that it should be analyzed with genes associated with the elongation factor (EF-1a), the major RNA polymerase I subunit (RPB1) and second largest subunit (RPB2) (O'Donnell *et al.*, 2015). The objective of this research was to identify the *Fusarium* species obtained from the root and soil of commercial blue agave plantations associated with wilting and dry bud in Los Altos, Jalisco through morphological, epidemiological and molecular techniques in order to know the diversity and regional prevalence that contributes to the establishment of methodological, operational and management strategies that support the Agave Phytosanitary Integral System (SIVEA), the basis of the agave phytosanitary campaign.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The sample collection was carried out in 40 commercial plantations of 3-4 years distributed in 13 counties of Los Altos, Jalisco (Table 1). Plantations were selected using epidemic inductive criteria integrated in the REG-N methodology (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Coria-Contreras *et al.*, 2018). Additionally, the predominant planting symptomatology and phytosanitary condition was considered: wilting (M), dry bud rot (P), apparently healthy (AS) and unproductive (IP). The IP plots were chosen because of its high incidence backgrounds, causing their abandonment for commercial agave production.

Sampling method. In plantations with M and P, sampling was carried out around initial foci with

el Sistema Integral de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del agave (SIVEA), base de la campaña fitosanitaria del agave.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La colecta de muestras se realizó en 40 plantaciones comerciales de 3-4 años distribuidas en 13 municipios de Los Altos, Jalisco (Cuadro 1). Las plantaciones se seleccionaron mediante criterios de inductividad epidémica integrados en la metodología REG-N (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Adicionalmente se consideró la sintomatología y condición fitosanitaria predominante de plantación: marchitez (M), pudrición seca de cogollo (P), aparentemente sano (AS) e improductivos (IP). Las parcelas IP fueron elegidas por antecedentes de incidencia alta, causando su abandono para producción comercial de agave.

Método de muestreo. En plantaciones con M y P, el muestreo se realizó en torno a focos iniciales con 1-4 plantas contiguas con severidad 3-4 de marchitez (M) y/o 3-5 de pudrición seca (P) según clases de escala diagramática propuesta por Jiménez-González y colaboradores (2017). Se integraron cinco submuestras, dos intra-foco y tres de perifoco, para conformar una muestra compuesta de 500 g de suelo y raíces. La submuestra se tomó con una pala cilíndrica metálica diseñada para estandarizar el volumen de colecta a 10 cm del cuello de planta y a 35 cm de profundidad. Para AS se aplicó misma metodología en una sección interna de plantación en torno a plantas aparentemente sanas. En parcelas IP, la muestra compuesta consistió únicamente de suelo colectado en el tercio medio del predio. Cada muestra compuesta se dividió para análisis microbiológico y fisicoquímico. Este último

1-4 contiguous plants with 3-4 severity wilt (M) and / or 3-5 dry rot (P) according to classes of diagrammatic scales proposed by Jiménez-González *et al.* (2017). Five subsamples, two intra-focal and three peripheral, were integrated to form a sample composed of 300 g of soil and roots. The subsample was taken with a metal cylindrical shovel designed to standardize the collection volume at 10 cm from the plant neck and at 35 cm depth. For AS, the same methodology was applied in an internal section of the plantation around apparently healthy plants. In IP plots, the compound sample consisted solely of soil collected in the middle third of the land. Each compound sample was divided for microbiological analysis and physicochemical analysis. The latter was carried out in the soil fertility laboratory of the Colegio de Postgraduados.

Isolates and morphological characterization.

Fusarium isolates were obtained from soil samples by dilutions of stock solution (SM), for which 5 g of soil, properly homogenized and grounded were placed in Falcon tubes with 45 mL of sterile distilled water (1:9/p:v). The mixture was homogenized by a stirring equipment for 5 minutes. A $1 \times 10^{0.5}$ dilution, obtained with 1 mL of SM in 1 mL of sterile distilled water was selected to optimize the colony count. Through a Drigalsky spatula, a 0.1 mL aliquot was distributed in a modified Komada medium, with three Petri dishes as repetitions. The PCNB in Komada was added previous to the sterilization in order to reduce its fungicidal effectiveness and allow a controlled growth of other fungi besides *Fusarium*. The root tissue (<0.5cm) was disinfested for 1 min with 2% hypochlorite, followed by 1 min in 70% alcohol and three washes with sterile distilled water. Four 1 cm pieces were sown per Petri dish; each piece of tissue was taken as a repetition. Sowings were incubated at 28 °C for 5-7 days. Subsequently, putative *Fusarium* colonies

Cuadro 1. Condición fitosanitaria, identificación y localización de 40 plantaciones comerciales de *Agave tequilana* de 3-4 años de edad, seleccionadas por criterios de inductividad epidémica para estudio etiológico regional de marchitez y pudrición seca del cogollo del agave en Los Altos, Jalisco. Verano 2016.

Table 1. Phytosanitary condition, identification and location of 40 commercial plantations of *Agave tequilana* 3-4 years old, selected by criteria of epidemic inductivity for regional etiological study of wilting and dry bud rot at Los Altos, Jalisco. Summer 2016.

Condición Fitosanitaria	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	ID Plantación
Marchitez de planta	Arandas	20.695398	-102.326988	2082	A-ARA-M09
		20.850716	-102.158635	1954	A-ARA-M10
		20.580920	-102.516410	1940	A-ATO-M04
	Atotonilco A.	20.515050	-102.612560	1624	A-ATO-M03
		20.56022	-102.53321	1911	A-ATO-M15
		20.630650	-102.213000	2132	A-JM-M11
	Jesús María	20.613504	-102.266203	2026	A-JM-M12
		20.707930	-102.122470	2235	A-JM-M14
		20.595730	-102.156940	2172	A-JM-M13
	Ayotlán	20.606100	-102.378590	1946	A-AYO-M06
		20.601070	-102.402080	1901	A-AYO-M05
		20.674480	-102.505280	1949	A-SICG-M08
	San Ignacio C. G.	20.724880	-102.467340	2014	A-SICG-M07
		20.367180	-102.836960	1533	A-PON-M01
	Zapotlanejo	20.575610	-102.889340	1556	A-ZAP-M02
Pudrición seca del cogollo	Arandas	20.683519	-102.264241	2003	A-ARA-P11
		20.745702	-102.324358	2222	A-ARA-P05
		20.694717	-102.324106	2243	A-ARA-P10
		20.631250	-102.272260	2053	A-ARA-P12
	Jesús María	20.723180	-102.127880	2271	A-JM-P14
		20.708100	-102.122040	2238	A-JM-P13
		20.692854	-102.065208	2250	A-JM-P15
	Atotonilco A.	20.588600	-102.513800	1826	A-ATO-P06
		20.634495	-102.435671	1957	A-ATO-P07
	Ayotlán	20.581670	-102.370740	1944	A-AYO-P08
	Poncitlán	20.36105	-102.96944	1618	A-PON-P03
	San Ignacio C. G.	20.723920	-102.493020	2018	A-SICG-P09
	Tepatitlán M.	20.649600	-102.632200	1915	A-TEP-P02
	Yahualica G. G.	21.113520	-102.866870	1824	A-YAH-P01
	Zapotlanejo	20.576420	-102.889370	1869	A-ZAP-P04
Improductivos	Cuquío	21.016096	-103.006563	1810	A-CUQ-IP01
		20.98254	-103.02026	1860	A-CUQ-IP02
	Degollado	20.42574	-102.13187	1723	A-DEG-IP07
		20.46372	-102.21277	1748	A-DEG-IP08
	Tepatitlán M.	20.63825	-102.90195	1751	A-TEP-IP05
		20.63964	-102.638365	1904	A-TEP-IP04
	San Miguel A.	20.89801	-102.40221	2049	A-SMA-IP06
	Acatic	20.783383	-102.887821	1685	A-ACA-IP03
Aparentemente sanos	Jesús María	20.594201	-102.156956	2176	A-JM-AS01
	Atotonilco A.	20.662899	-102.472285	1840	A-ATO-AS02

se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Aislados y caracterización morfológica. Aislados de *Fusarium* se obtuvieron a partir de muestras de suelo mediante diluciones de solución madre (SM), para la cual se colocaron 5 g de suelo, debidamente homogeneizado y triturado, en tubos Falcon con 45 mL de agua destilada estéril (1:9/p:v). La mezcla se homogeneizó mediante agitación en Vortex por 5 min. Se seleccionó una dilución $1 \times 10^{0.5}$, obtenida con 1 mL de SM en 1 mL de agua destilada estéril, para optimizar el conteo de colonias. Mediante espátula Drigalsky se distribuyó una alícuota de 0.1 mL en medio Komada modificado, con tres cajas Petri como repeticiones. El PCNB en Komada se adicionó previo a la esterilización para reducir su efectividad fungicida y permitir el crecimiento controlado de otros hongos además de *Fusarium*. El tejido de raíz (<0.5 cm) se desinfectó por 1 min con hipoclorito al 2%, seguido de 1 min en alcohol 70% y tres lavados con agua destilada estéril. Cuatro trozos de 1 cm se sembraron por caja Petri; cada trozo de tejido se tomó como una repetición. Las siembras se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Posteriormente, putativas colonias de *Fusarium* se transfirieron a medio SNA-Agar modificado (Leslie y Summerell, 2006). Se incubaron durante cinco días y se obtuvieron 1-2 cultivos monospóricos por aislado usando una dilución de conidios de 1×10^6 . La caracterización de aislados se realizó con crecimientos en medios Komada, SNA, CLA, PDA y Sabouraud según el atributo de interés (Leslie y Summerell, 2006). Los caracteres analizados fueron: coloración micelial; presencia o ausencia de monofialides, polifialides, clamidosporas, células conidiogénicas; y tipo, forma, septos y tamaño de conidios (Leslie y Summerell, 2006; Gogoi *et al.*, 2017). Las observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss modelo Axio Imager A1

were transferred to a modified SNA-Agar medium (Leslie and Summerell, 2006). They were incubated for five days and 1-2 monosporic cultures were obtained per isolate.

The characterization of isolates was performed with their growth in Komada, SNA, CLA, PDA and Sabouraud media according to the attribute of interest (Leslie and Summerell, 2006). The analyzed characters were: mycelial coloration; presence or absence of monofialides, polyhalides, klamidospora, conidiogenous cells, and type, shape, septa and size of conidia (Leslie and Summerell, 2006). The observations were made in a Carl Zeiss microscope model Axio Imager A1 with AxioCam ICc1 image analysis system and the AxioVision digital program.

DNA extraction, PCR and sequencing. For the molecular identification a total of 13 monosporic isolates obtained from soil and 12 from the root were selected by their representativeness out of 109 isolates based on *in vitro* cultural characteristics, morphology, source of isolation, prevalence and regional disease inductivity. Genomic DNA was extracted by the Sambrook and Russell method. The DNA concentration and quality was verified with NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) and the concentration was homogenized at $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ for the polymerase chain reaction (PCR). The ITS region of the ribosomal DNA was amplified using the published parameters (White *et al.*, 1990) and the elongation factor gene (*EF-1a*) with the initiators EF1 * (5'-ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2 * (5'- GGA DGT ACC AGT RAT CAT G). Each PCR reaction for *EF-1a* consisted of a mixture of 0.8 X of PCR buffer solution, 1.6 mM of MgCl_2 (50mM), 0.2 μM of deoxynucleotide triphosphate (dNTP's), 0.2 pmol of each initiator, 0.5 units of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 2.5 μL of DNA ($40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) at

con sistema de análisis de imagen AxioCam ICc1 y el programa digital AxioVision.

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. Para la identificación molecular, de un total de 109 aislados se seleccionaron por representatividad 13 aislados monospóricos obtenidos de suelo y 12 de raíz, con base a características culturales *in vitro*, morfología, fuente de aislamiento, prevalencia e inducibilidad regional de enfermedad. El ADN genómico se extrajo por el método Sambrook y Russell. La concentración y calidad del ADN se verificó con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se homogeneizó a $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se amplificó la región ITS del ADN ribosomal usando los parámetros publicados (White *et al.*, 1990) y el gen factor de elongación (EF-1a) con los iniciadores EF1* (5' – ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) / EF2* (5' – GGA DGT ACC AGT RAT CAT G). Cada reacción PCR para EF-1a consistió en una mezcla de 0.8 X de solución buffer de PCR, 1.6 mM de MgCl_2 (50mM), 0.2 μM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 0.2 pmol de cada iniciador, 0.5 unidades de Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 2.5 μL de ADN ($40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) a un volumen final de 25 μL . Las condiciones PCR en termociclador (T-100, BioRad) consistieron de un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s, a 58°C por 40 s y a 72°C por 55 s y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de ambas amplificaciones fueron analizados en gel agarosa 1.5% a 90 Volts por 90 min, se tiñó con bromuro de etidio y se reveló con luz UV en fotodocumentador (UVP, BioImaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). Los fragmentos amplificados de 550 y 750 pb aproximadamente se secuenciaron en MacroGen Inc., Korea.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenético. Las secuencias se editaron con el programa

a final volume of 25 μL . The PCR conditions in thermal cycler (T-100, BioRad) consisted of an initial cycle of denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, at 58°C for 40 s and 72°C for 55 s and a final extension at 72°C for 7 min. The products of both amplifications were analyzed in 1.5% agarose gel at 90 Volts for 90 min, stained with ethidium bromide and developed with UV photodocumenting light (UVP, BioImaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). The amplified fragments of approximately 550 and 750 bp were sequenced by MacroGen Inc., Korea.

Sequence alignment and phylogenetic analysis.

The sequences were edited with the SeqAssem program and compared by BLASTn with the *Fusarium*-ID, *Fusarium*-MLST and GenBank databases to determine taxon identity based on comparative sequence similarity, expressed as identity percentage. To determine phylogenetic relationships and confirm identification, the sequences obtained were aligned with GenBank reference sequences, using the MUSCLE and Maximum likelihood (ML) algorithm in MEGA7 with 1000 Bootstrap replications. The model selected for ML was Kimura-2 parameters +G. *F. dimerum* (NRRL 36140) was integrated as an external group. Representative sequences of *Fusarium* sp. were recorded in Genbank. with accession number MH172303 for the FOSC complex and MH179126 for the FSSC complex.

Regional analysis of *Fusarium* Index. Samples from soil were only used to evaluate the number of colonies (*n*) of *Fusarium* spp. and of total fungi in Komada cultivate medium at seven days of incubation. Each sample had three repetitions consisting of the same number of Petri dishes 90x15 mm. The *Fusarium* Index (IF) was generated as, $IF = (n - \text{colonias } Fusarium \text{ spp}) / (n - \text{hongos totales})$ where $IF \approx 1.0$ indicates higher charge of *Fusarium* spp. in the soil sample.

SeqAssem y se compararon mediante BLASTn con bases de datos *Fusarium*-ID, *Fusarium*-MLST y GenBank para determinar identidad de taxones con base en similitud comparativa de secuencias, expresado en porcentaje de identidad. Para determinar relaciones filogenéticas y confirmar la identificación, las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de referencia del GenBank, utilizando el algoritmo MUSCLE y se analizaron con Máxima verosimilitud (ML) en MEGA7 con 1000 replicaciones Bootstrap. El modelo seleccionado para ML fue Kimura-2 parámetros +G. Se integró a *F. dimerum* (NRRL 36140) como grupo externo. Secuencias representativas de *Fusarium* sp. fueron registradas en Genbank. con número de accesión MH172303 para el complejo FOOSC y MH179126 para el complejo FSSC.

Cálculo del Índice de *Fusarium*. Únicamente de muestras de suelo, el número de unidades formadoras de colonia (n) de *Fusarium* spp. y de hongos totales se contabilizó en medio de cultivo Komada a siete días de incubación. Cada muestra tuvo tres repeticiones consistentes en igual número de cajas Petri 90x15 mm. El Índice de *Fusarium* (IF) se generó como $IF = (n - \text{colonias } Fusarium \text{ spp}) / (n - \text{hongos totales})$, donde $IF \approx 1.0$ indica mayor carga de *Fusarium* spp. en la muestra de suelo.

Análisis del índice de *Fusarium* con pH y Materia orgánica. Se analizó la dependencia univariada del Índice de *Fusarium* (IF) con pH y materia orgánica (MO) por medio de adaptaciones a los modelos exponencial negativo [$\ln(y) = a - b(x)$] y Gregory [$\ln(y) = a - b \ln(x)$]; donde y representa el Índice de *Fusarium*, x valores de pH y MO, a y b son parámetros de ajuste y tasa, respectivamente. Un total de 28 parcelas comerciales con análisis de pH y MO fueron incluidas en este análisis.

***Fusarium* index analysis with pH and organic matter.** Univariate dependence of the *Fusarium* Index (IF) with pH and organic matter (MO) was analyzed throughout adaptations to the negative exponential models [$\ln(y) = a - b(x)$] and Gregory [$\ln(y) = a - b \ln(x)$]; where y represents the *Fusarium* Index, x values of pH and MO, a and b are parameters of adjustment and rate, respectively. A total of 28 commercial plots with pH and MO analyzes were included in this analysis.

RESULTS

Morphological and cultural characterization.

A total of 109 *Fusarium* isolates were obtained from 248 *in vitro* cultures from 40 soil samples (57 isolates) and 32 from root (52). The Komada medium, due to its specificity to *Fusarium*, was suitable to isolate the fungus from both soil and root and to evaluate mycelial texture and coloration. CLA and SNA were optimal for inducing sporulation and evaluating spore type and septation. These mediums were complementary by differential response between strains (Table 2). In CLA and SNA, macroconidia predominated in a straight to slightly curved and falcate manner, from three to six cells, grouping into two groups: group A included strains with macroconidia of an average length of 26.01 μm (range: 17.12-57.62 μm), and group B with a mean of 33.19 μm (27.16-48.8 μm). One strain presented macroconidia with a length of 76.45 μm (Figure 1A-D). Ellipsoidal microconidia without septa and arranged in false heads in monophialids characterized group A, while in group B they presented a septum. In general, the microconidia had an average length of 10 μm and a range of 3.7-12.4 μm (Figure 1E-F). The size of phialides was decisive to differentiate

RESULTADOS

Caracterización morfológica y cultural. Un total de 109 aislados de *Fusarium* se obtuvieron a partir de 248 siembras *in vitro* provenientes de 40 muestras de suelo (57 aislados) y 32 de raíz (52). El medio Komada, por su especificidad a *Fusarium*, fue adecuado para aislar al hongo tanto de suelo como de raíz y para evaluar textura y coloración micelial. CLA y SNA fueron óptimos para inducir esporulación y evaluar tipo de esporas y septación. Estos medios fueron complementarios por respuesta diferencial entre cepas (Cuadro 2). En CLA y SNA, predominaron macroconidios de forma recta a ligeramente curva y falcada, de tres a seis células, agrupándose en dos grupos: grupo A incluyó cepas con macroconidios de longitud media de 26.01 μm (rango: 17.12-57.62 μm), y grupo B con media de 33.19 μm (27.16-48.8 μm). Una cepa presentó

between strains of group A and B. In the first case short phialides were observed with average length of 23.43 μm (Figure 1G-H) against long phialides of 147.91 μm on average of group B (Figure 1I-J). Chlamydospores were scarce in most strains; however, some isolates of both groups formed them individually or in a chain (Figure 1K). The morphological characteristics found and their variability matched the taxonomic description of the genus *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). The 109 isolates were placed at SENASICA-DGSV-CNRF collection. Isolates registered in genbank NCBI were: A115a=MH172303; A129a=MH179126.

In Komada, the isolates showed differences in mycelial texture with a smooth and cottony predominance. Ten colors were distinguished by colorimetry, highlighting white, purple, pinkish, 'salmon' and 'melon' (Figure 1L-P). In 57 root

Cuadro 2. Medios de cultivo seleccionados para aislamiento, purificación, caracterización cultural y morfológica de *Fusarium* spp. a partir de 248 siembras, provenientes de 40 plantaciones comerciales y 72 muestras de suelo y raíz de agave azul. Verano, 2016. Los Altos, Jalisco.

Table 2. Culture media selected for isolation, purification, cultural and morphological characterization of *Fusarium* spp. from 248 cultural sowings, from 40 commercial plantations and 72 samples of soil and blue agave root. Summer, 2016. Los Altos, Jalisco.

Medio de cultivo ^x	Objetivo	Coloración	Características observadas ^y		
			Esporulación	Esporas	Septación
Komada	Aislamiento	+	-	-	-
SNA	Inducción de esporulación y purificación	-	+	-	-
CLA	Caracterización morfológica de esporas	-	+	+	+
PDA	Caracterización cultural de colonias	+	-	-	-
Sabouraud	Purificación y obtención de cultivos monospóricos	+	-	-	-

^xSNA= Spezieller Nährstoffarmer Agar; CLA= agar hojas de clavel; PDA= agar papa dextrosa / SNA = Spezieller Nährstoffarmer Agar; CLA = carnation leaf agar; PDA = potato dextrose agar.

^yColoración= evaluación del color de 109 colonias con 7-10 días de crecimiento; Esporulación= cuantificación cualitativa de la producción de esporas (alta, media y baja); Esporas= presencia o ausencia y tamaño de macro y microconidios; tipo de clamidospora; Septación= cuantificación del número de septos en macro y microconidios / Coloration = color evaluation of 109 colonies at 7-10 days cultural growth; Sporulation = qualitative quantification of spore production (high, medium and low); Spores = presence or absence and size of macro and microconidia; type of clamidospora; Septation = quantification of number of septa in macro and microconidia.

macroconidios con longitud de 76.45 μm (Figura 1 A-D). Microconidios elipsoidales, sin septos y dispuestos en falsas cabezas en monofilídes caracterizaron al grupo A, mientras que en el grupo

isolates, from eight counties, six colors with greater frequency of white mycelium were determined in 19/57 isolates (33.3%), mainly in wilted plantations (Figure 2A), followed by pinkish isolates. In 52

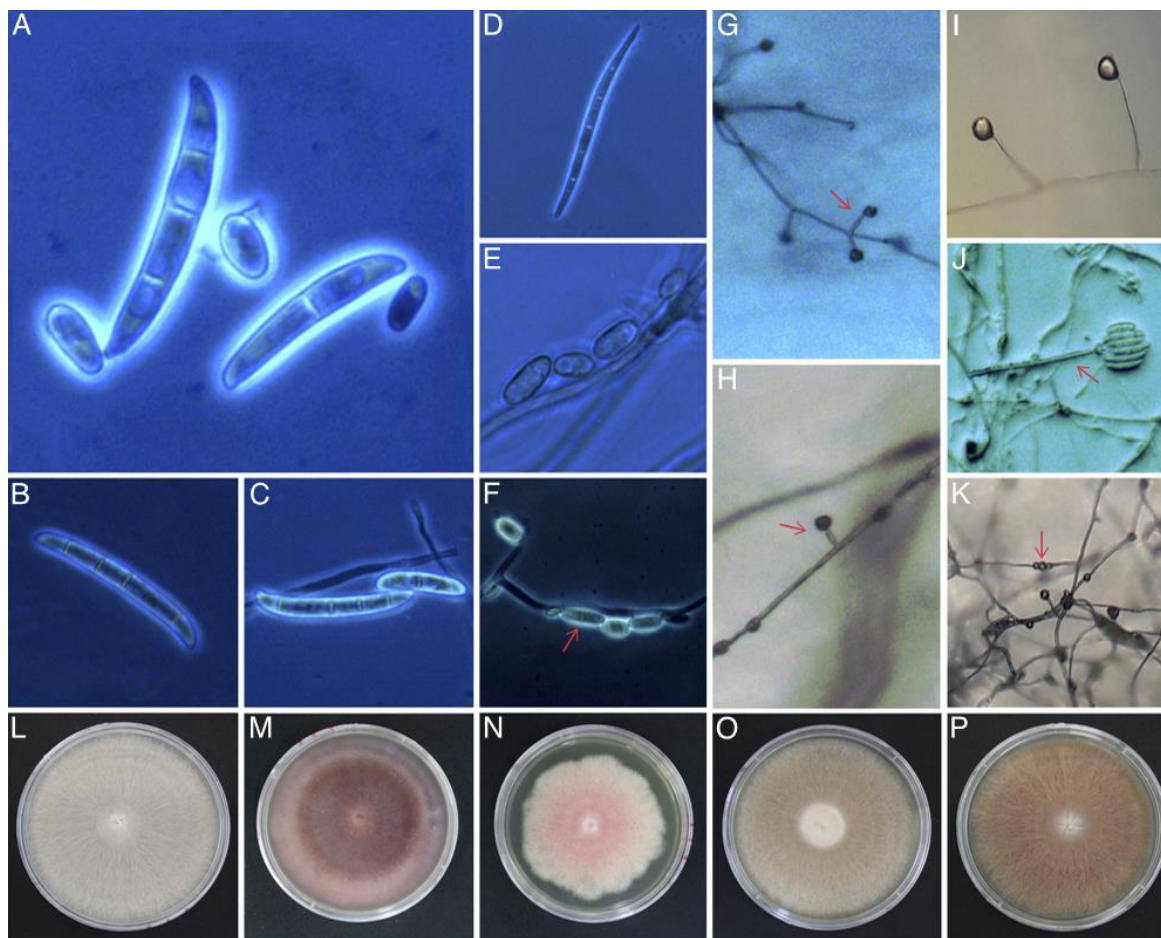


Figura 1. Ejemplo de características morfológicas y culturales empleadas en la caracterización de 109 cepas de *Fusarium* aisladas a partir de 248 siembras provenientes de 40 plantaciones comerciales y 72 muestras de suelo y raíz de agave azul. Macroconidios (A-D): A-B, Rectos ligeramente curvos (48.8 y 44.62 μm), de 3 a 6 septos, célula apical redondeada y célula basal con apenas muescas. C, Largo con una ligera curvatura dorso ventral (76.45 μm), de 6 septas, célula apical afilada y célula basal apenas con muescas. D, Curvado con tres septas (32.68 μm), célula apical corta, célula basal con muescas distintivas. Microconidios (E-F): E, Ovalados sin septas. F, Ovalados con una septa. Monofilídes (G-J): G-H, Cortas (23.43 μm). I-J, Largas (147.91 μm). Clamidosporas (K): En cadena. Coloración micelial en Komada (L-P): L, Blanco. M, Morado. N, Rosa. O, Melón. P, Salmón.

Figure 1. Example of morphological and cultural characteristics used in the characterization of 109 *Fusarium* isolates obtained from 248 sowings from 40 commercial plantations and 72 samples of soil and blue agave root. Macroconidia (A-D): A-B, slightly curved straight (48.8 and 44.62 μm), 3 to 6 septa, rounded apical cell and basal cell with barely notches. C, Long with a slight curvature of the ventral dorsum (76.45 μm), of 6 septa, sharp apical cell and basal cell barely notched. D, Curved with three septa (32.68 μm), short apical cell, basal cell with distinctive notches. Microconidia (E-F): E, Oval without septa. F, Oval with a septa. Monophialides (G-J): G-H, Short (23.43 μm). I-J, Long (147.91 μm). Chlamydospores (K): In chain. Mycelial coloration in Komada (L-P): L, White. M, Purple. N, Pink. O, 'Melon'. P, 'Salmon'.

B presentaron un septo. En general, los microconidios tuvieron una longitud media de 10 μm y rango de 3.7-12.4 μm (Figura 1 E-F). El tamaño de fíalides fue determinante para diferenciar entre cepas del grupo A y B. En el primer caso se observaron fíalides cortas con longitud media de 23.43 μm (Figura 1 G-H) contra fíalides largos de 147.91 μm en promedio del grupo B (Figura 1 I-J). Las clamidosporas fueron escasas en la mayoría de cepas; sin embargo, algunos aislados de ambos grupos, las formaron individualmente o en cadena (Figura 1 K). Las características morfológicas encontradas y su variabilidad concordaron con la descripción taxonómica del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Las 109 cepas se entregaron en resguardo a SENASICA-DGSV-CNRF. Aislados seleccionados para registro en el banco de genes de NCBI fueron: A115a=MH172303; A129a=MH179126.

En Komada, las cepas mostraron diferencias en textura micelial con predominancia lisa y algodonosa. Por colorimetría se diferenciaron diez colores sobresaliendo blanco, morado, rosáceo, salmón y melón (Figura 1 L-P). En 57 aislados de raíz, provenientes de ocho municipios, se determinaron seis colores con mayor frecuencia de micelio blanco en 19/57 aislados (33.3%), principalmente en plantaciones con marchitez (Figura 2 A), seguido de aislados rosáceos. En 52 aislados de suelo de 11 municipios se tuvo toda la gama de colores con dominancia del morado en 14/52 aislados (26.92%) en las cuatro condiciones fitosanitarias (Figura 2 C; Cuadro 1 y 3), pero asociado principalmente a plantaciones con pudrición seca del cogollo (Figura 2 B). El blanco fue el segundo color observado (Figura 1 L-P; Figura 2 C). En Arandas se obtuvo la mayor diversidad de color micelial para aislados de suelo y raíz seguido de Jesús María con abundancia de salmón, morado y blanco. En Tepatitlán sobresalió la combinación morado-rosácea para aislados de suelo en plantaciones improductivas y con

soil isolates from 11 counties, the entire range of colors with purple dominance was observed in 14/52 isolates (26.92%) in the four phytosanitary conditions (Figure 2C; Table 1 and 3), but mainly associated with dry bud rot plantations (Figure 2B). White was the second color observed (Figure 1L-P; Figure 2C). In Arandas, the greatest diversity of mycelial color was obtained for soil and root isolates, followed by Jesús María with abundance of 'salmon', purple and white. In Tepatitlán, the purple-pink combination for soil isolates in unproductive plantations and with dry bud rot stood out. In Jesús María, soil isolates from apparently healthy plantations were distinguished by white and purple mycelia (Figure 2C).

Molecular identification and phylogeny. From 25 strains selected for molecular analysis, optimal fragments of 550 bp ITS and 760 bp *EF-1a* were obtained (Figure 3). The use of STIs allowed the identification of strains at a genus level, but not at a species level because the sequence alignment between members of a species complex or between closely related species was not reliable. The partial sequence analysis of the *EF-1a* gene along with morphological characterization determined five *Fusarium* species (two of which unidentified) associated with wilting and dry bud rot, isolated from root and soil, which corresponded to three complexes of species of *Fusarium*: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), with 9 haplotypes, represented morphological group A; *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of the *Fusarium solani* (FSSC) species complex, with 2, 2 and 1 haplotype, respectively, of morphological group B; and *Fusarium* sp. of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) with a haplotype. The percentage of coverage and identity for species identification was 98-100%, with an E-value = 0. Representative sequences of the two main complexes, FOSC and

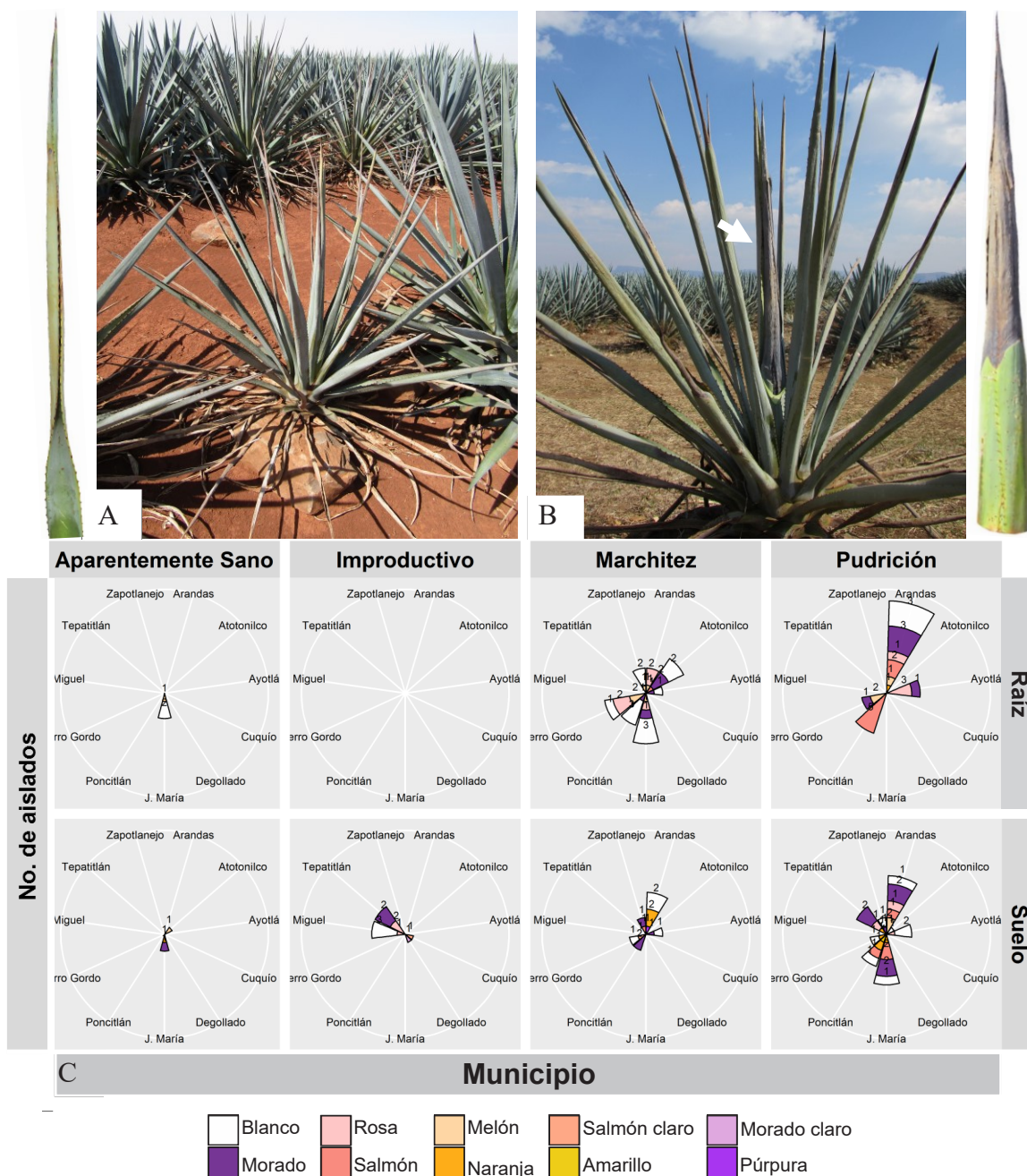


Figura 2. Plantas enfermas de focos seleccionados para muestreo. A) Planta con síntomas de marchitez severidad clase 4. Costado izquierdo, hoja con enrollamiento y deshidratación severa. B) Planta con síntomas de pudrición seca del cogollo severidad clase 5. Cogollo completo con secamiento avanzado (flecha). Costado derecho, cogollo con pudrición descendente y textura seca rígida. C) Diversidad de color micelial de 109 cepas de *Fusarium* spp. caracterizados en medio Komada, provenientes de 72 muestras de suelo y raíz de 40 plantaciones comerciales y 13 municipios de Los Altos, Jalisco. Verano 2016.

Figure 2. Diseased plants of selected foci for sampling. A) Plant with symptoms of wilt, severity class 4. Left side, leaf with curl and severe dehydration. B) Plant with symptoms of dry bud rot, severity class 5. Complete bud with advanced drying (arrow). Right side, bud with descending rot and rigid dry texture. C) Diversity of mycelial color of 109 isolates of *Fusarium* spp. characterized in Komada, obtained from 72 soil and root samples of 40 commercial plantations and 13 counties at Los Altos, Jalisco. Summer 2016.

podrición seca. En Jesús María, aislados de suelo en plantaciones aparentemente sanas se distinguieron por micelio blanco y morado (Figura 2C).

Identificación molecular y filogenia. A partir de 25 cepas seleccionadas para análisis molecular se obtuvieron fragmentos óptimos de 550 pb ITS y 760 pb EF-1a (Figura 3). El uso de ITS permitió la identificación de cepas a nivel género, pero no a especie, debido a que la alineación de secuencias entre miembros de un complejo de especies o entre especies estrechamente relacionadas no fue confiable. El análisis de secuencias parciales del gen EF-1a, aunado a la caracterización morfológica, determinó cinco especies de *Fusarium*, dos sin identificar, asociadas a marchitez y pudrición seca del cogollo, aislados de raíz y suelo, que correspondieron a tres complejos de especies de *Fusarium*: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC), con 9 haplotipos, representó al grupo morfológico A; *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC), con 2, 2 y 1 haplotipo, respectivamente, del grupo morfológico B; y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) con un haplotipo. El porcentaje de cobertura e identidad para identificación de especies fue de 98-100%, con un E-value = 0. Secuencias representativas de los dos complejos principales, FOSC y FSSC, fueron registradas en Genbank con número de acceso MH172303 y MH179126, respectivamente (Cuadro 3). El análisis filogenético con base en el gen EF-1a confirmó la identificación taxonómica de cepas y mostró claramente el nivel de variabilidad y agrupación por complejos de especies con soporte estadístico de 73-100%. Las cepas de FSSC, a excepción del A185s, se agruparon con secuencias de referencia. En FOSC, únicamente 3/14, aislados se agruparon con secuencias de referencia, el resto se agrupó en clados distintos y asociados a valores de confiabilidad bajos (Figura 3), lo cual

FSSC, were registered in Genbank with accession number MH172303 and MH179126, respectively (Table 3).

The phylogenetic analysis based on the *EF-1a* gene confirmed the taxonomic identification of strains and clearly showed the level of variability and association by species complexes with statistical support of 73-100%. The FSSC strains with the exception of the A185s were grouped with reference sequences. In FOSC only 3 out of 14 isolates were grouped with reference sequences, whereas the rest were grouped into different clades and associated with low reliability values (Figure 3), which suggests greater genetic variation and adaptation of *F. oxysporum* to regional diversity of the agave production system. The only FFSC isolate, both in GenBank and phylogenetically, was grouped next to *F. andiyazi* but without corresponding to this species (Figure 3).

Prevalence and symptomatic association. The *F. oxysporum* (FOSC) complex was the most prevalent with 6/13 (46.15%) soil strains and 8/12 (66.66%) root stains, mainly associated with wilting. The *Fusarium solani* complex (FSSC) was the second in regional importance with *F. falciforme* 5/13 (38.46%) strains isolated only from soil, *F. solani* in 1/13 (7.9%) and 3/12 (25%) strains of soil and root, respectively, and with a strain denoted as *Fusarium* sp., isolated from the root 1/12 (8.33%). The strains of this complex were associated in the same proportion to plantations with wilting and dry bud rot. Two strains were associated with unproductive sites. *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) *Fusarium* sp., which was isolated from the root was associated with wilting symptoms (Figure 4). At the level of haplotypes by species, i.e. intraspecific sequence variants, *F. oxysporum* had six haplotypes associated solely with wilting, two with dry rot and one to both types of symptoms; *F. solani* had one associated exclusively to wilt and another

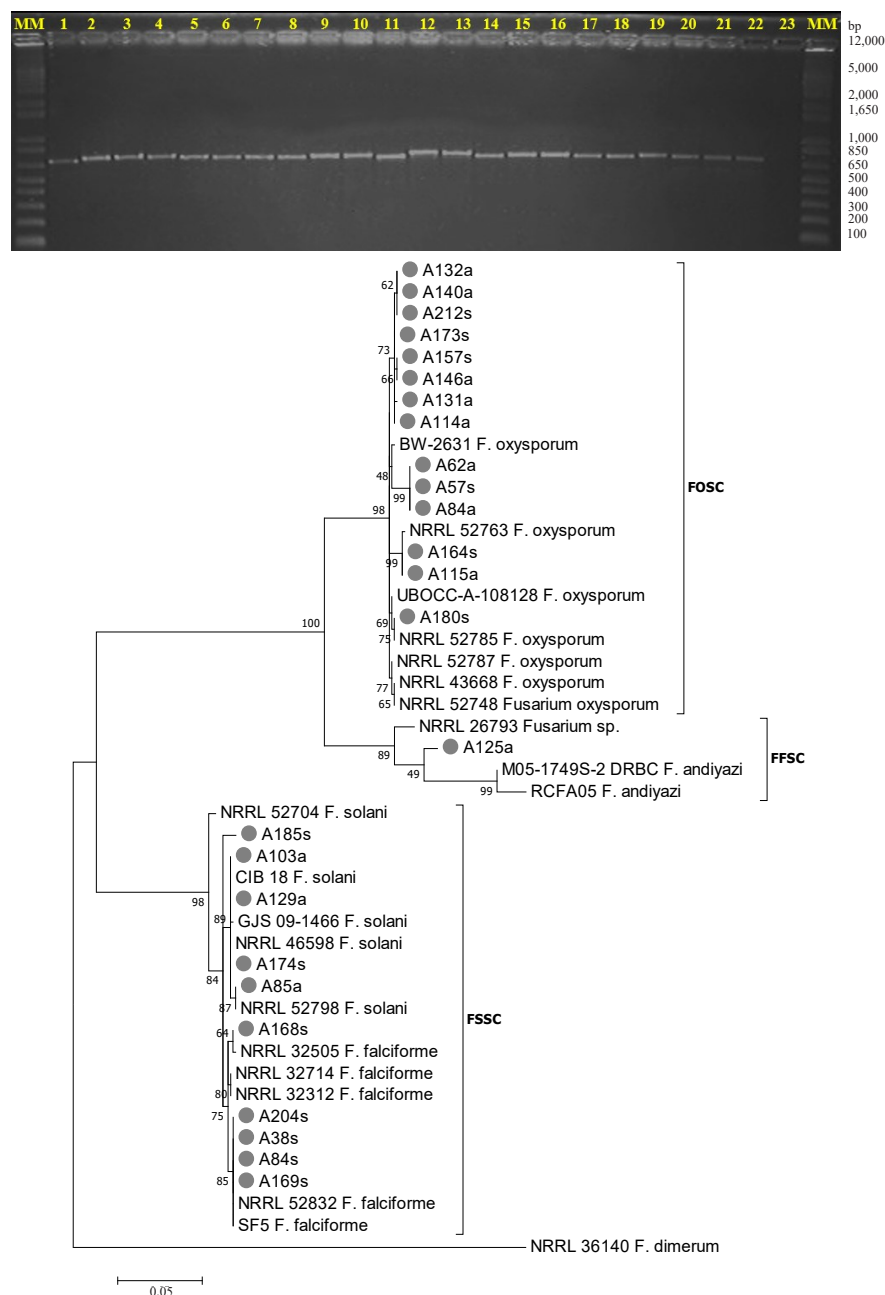


Figura 3. Imagen superior: Ejemplo de amplificación de productos PCR con gen EF-1a (760 pb). Carriles 1-21: ADN de *Fusarium* spp. 21: *F. oxysporum* (control), 23: Blanco con H₂O. MM: Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen. Inferior: Filogenia de 25 cepas de *Fusarium* spp. de suelo y raíz de *A. tequilana* (marcados con ●) basada en el gen EF-1a, mediante Máxima verosimilitud (ML) y Kimura-2 parámetros +G con 1000 repeticiones Bootstrap. Claves texto y numeral son secuencias de referencia del GenBank.

Figure 3. Top image: Example of amplification of PCR products with EF-1a gene (760 bp). Lanes 1-21: *Fusarium* spp. DNA 21: *F. oxysporum* (control), 23: White with H₂O. MM: 1kb plus Invitrogen molecular weight marker. Bottom: Phylogeny of 25 isolates of *Fusarium* spp. of soil and root of *A. tequilana* (marked with ●) based on the EF-1a gene, using Maximum likelihood (ML) and Kimura-2 parameters +G with 1000 Bootstrap repetitions. Text and numeral keys are GenBank reference sequences.

Cuadro 3. Fuente de aislamiento e identificación molecular, con base en la secuencia parcial del gen EF-1a, de 25 cepas de *Fusarium* spp. seleccionadas de un acervo de 109 cepas aisladas de suelo y raíz en cuatro condiciones fitosanitarias y previamente caracterizadas morfológica y culturalmente.

Table 3. Source of isolation and molecular identification, based on the partial sequence of the EF-1a gene, of 25 strains of *Fusarium* spp. selected from a collection of 109 isolates obtained from soil and root in four phytosanitary conditions and previously characterized morphologically and culturally.

Fuente de Aislamiento	Especie/Complejo ^x	Condición Fitosanitaria	ID aislado	Cobertura ^y %	Identidad ^y %	Secuencia Referencia
Suelo	<i>F. oxysporum</i> [FOSC]	Marchitez	A173s	100	99	KP964900
			A157s	100	99	JF740855
			A164s	100	99	JF740837
		Pudrición	A57s	100	98	JF740855
			A180s	100	100	JF740853
	<i>F. solani</i> [FSSC]	Pudrición	A212s	100	99	JF740855
			A174s	100	99	JF740846
		Pudrición	A185s	100	100	-
	<i>F. falciforme</i> [FSSC]	Improductivo	A38s	100	99	GU170631
			A84s	100	99	GU170631
		Marchitez	A169s	100	99	GU170631
			A168s	100	99	GU170631
			A204s	100	99	GU170631
Raíz	<i>F. oxysporum</i> [FOSC]	A. sano	A132a	100	99	JF740855
			A114a	100	99	JF740855
			A84a	100	98	JF740855
			A115a ^z	100	99	JF740837
			A131a	100	98	JF740855
	<i>F. solani</i> [FSSC]	Marchitez	A140a	100	99	JF740855
			A62a	100	98	JF740855
			A146a	100	98	JF740855
			A103a	100	98	JF740846
			A85a	100	99	EF452941
	<i>Fusarium</i> sp. [FFSC]	Marchitez	A129a ^z	100	99	EF452945
			A125a	100	100	-

^xIdentificación taxonómica de aislados de suelo y raíz a nivel de género, especie y complejo mediante caracterización morfológica y molecular con EF-1a / Taxonomic identification of soil and root isolates at the genera level, species and species complex through morphological and molecular characterization with EF-1a.

^yCobertura % = Valor de cobertura en porcentaje determinado por nBLAST de NCBI usado en la identificación de cada aislado; Identidad % = Valor de identidad en porcentaje determinado por nBLAST de NCBI / Coverage% = Coverage value in percentage determined by NCBL nBLAST used in the identification of each isolate; Identity% = Identity value in percentage determined by NCBL nBLAST.

^zAislados seleccionados para registró en el banco de genes de NCBI: A115a=MH172303; A129a=MH179126 / Isolated selected for registration in the NCBI gene bank: A115a = MH172303; A129a = MH179126.

sugiere mayor variación genética y adaptación de *F. oxysporum* a la diversidad regional del sistema productivo agave. El único aislado del FFSC, tanto en GenBank como filogenéticamente, se agrupó próximo a *F. andiyazi* pero sin corresponder a esta especie (Figura 3).

that shared both. *F. falciforme*, although it had a specific haplotype associated with wilting, another haplotype shared both types of symptoms and was found in unproductive soils. The two unidentified *Fusarium* species at a species level were associated with specific symptoms of wilting or dry rot. *F.*

Prevalencia y asociación sintomatológica. El complejo *F. oxysporum* (FOSC) fue el más prevalente con 6/13 (46.15%) cepas de suelo y 8/12 (66.66%) de raíz, principalmente asociado con marchitez. El complejo *Fusarium solani* (FSSC) fue el segundo en importancia regional con *F. falciforme* 5/13 (38.46%) cepas aisladas únicamente de suelo, *F. solani* en 1/13 (7.9%) y 3/12 (25%) cepas de suelo y raíz, respectivamente, y con una cepa denotada como *Fusarium* sp. aislada de raíz 1/12 (8.33%). Las cepas de este complejo se encontraron asociadas en la misma proporción en plantaciones con marchitez y pudrición seca del cogollo. Dos cepas se asociaron a sitios improductivos. Del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium* sp. aislado de raíz, se asoció con síntomas de marchitez (Figura 4). A nivel de haplotipos por especie, i.e. variantes de secuencia intraespecíficos, *F. oxysporum* tuvo seis haplotipos asociados únicamente a marchitez, dos a pudrición seca y uno común a ambos tipos de síntomas; *F. solani* tuvo uno exclusivo a marchitez y otro común. *F. falciforme*, aunque tuvo un haplotipo específico a marchitez, otro haplotipo fue común y además se encontró en suelos improductivos. Las dos especies de *Fusarium* no identificadas a nivel de especie se asociaron con síntomas específicos de marchitez o pudrición seca. *F. oxysporum* tuvo en total cinco haplotipos repetidos. Cuatro asociados a diferentes municipios y síntomas lo cual fortalece la mayor condición prevalente de esta especie.

Análisis regional del Índice de *Fusarium*. El IF fue mayor en Atotonilco y Poncitlán con valores de 0.95 y 0.91, respectivamente, asociados a plantaciones con pudrición seca. Para marchitez, los municipios con mayor IF fueron San Ignacio C. G. y Ayotlán con valores de 0.48 y 0.45, respectivamente. Los IF más bajos (<0.25) se obtuvieron en Ayotlán, Arandas y Zapotlanejo asociados a

oxysporum had five repeated haplotypes. Four were associated to different counties and symptoms supporting the highest prevalence of this species.

Regional analysis of the *Fusarium* Index. FI was higher in Atotonilco and Poncitlán with values of 0.95 and 0.91 respectively. These values were associated with plantations with dry rot. In the case of wilting rot the counties with the highest FI were San Ignacio C. G. and Ayotlán with values of 0.48 and 0.45, respectively. The lowest FIs (<0.25) were obtained in Ayotlán, Arandas and Zapotlanejo in the case of dry rot, and in J. María, Poncitlán and Atotonilco for wilt (Figure 5A). In plantations with apparently asymptomatic agaves, FI was 0.49 and 0.42 for Atotonilco and J. María respectively, whereas in unproductive plots of Cuquío, Degollado and Tepatitlán, FI was within the range of 0.37–0.58. These results show the wide distribution of *Fusarium* and the epidemic risk it represents. Among the total fungi counted in soil samples some genus with antagonistic and suppressive capacity such as *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Bionectria* spp. and *Aspergillus* spp. were found.

FI had an inversely proportional relationship with soil pH and MO ($p \leq 0.02$). The FI decremental rate with respect to the increase in pH was adequately estimated with the negative exponential model ($b = 0.83$, $r^2 = 0.71$, $p < 0.0001$) and Gregory ($b = 4.91$, $r^2 = 0.72$, $p = 0.0098$). With these models, it was estimated that $\text{pH} \leq 5.5$ is inductive to *Fusarium* ($FI \geq 0.33$). The highest *Fusarium* Index (0.92) was at a pH of 4.6 and the lowest (0.1) in neutral-alkaline soils (6.9–7.7) (Figure 5B). With respect to MO, the estimated rate was slightly better with the negative exponential model ($b = 0.64$, $r^2 = 0.68$, $p < 0.0001$) than with Gregory ($b = 1.98$, $r^2 = 0.63$, $p = 0.0238$). Similarly, it was estimated that $\text{MO} \leq 2.5$ is inductive to *Fusarium* ($FI \geq 0.30$). Thus,

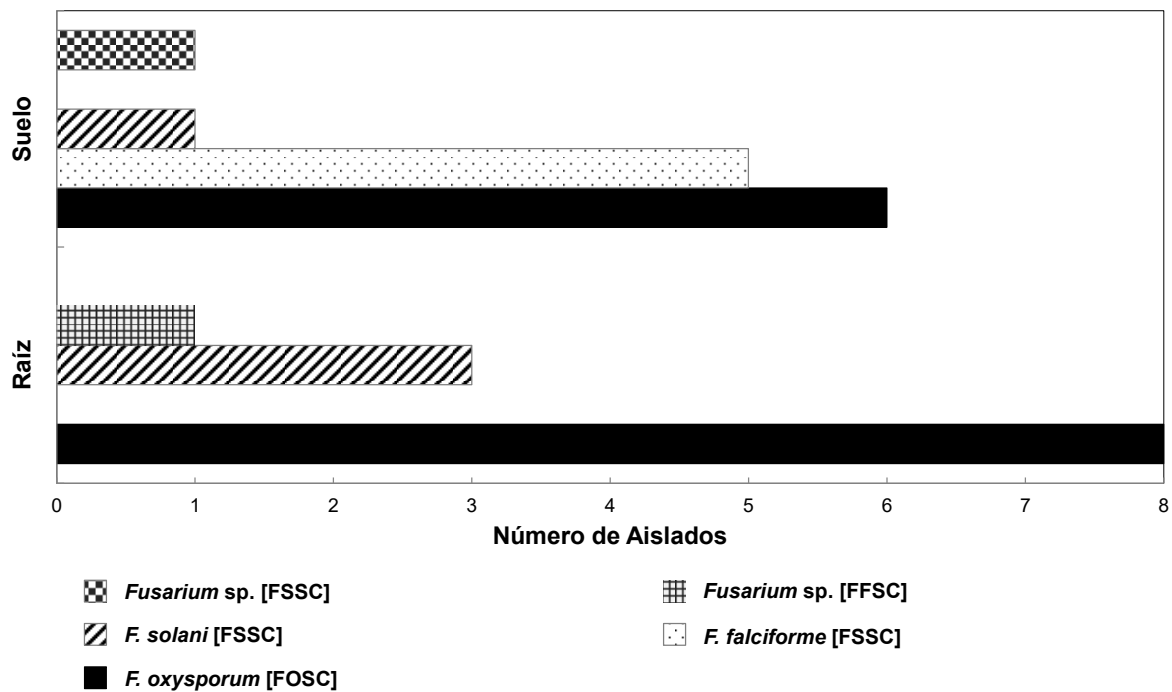


Figura 4. Frecuencia de especies/complejo en 25 cepas de *Fusarium* spp. seleccionadas de un acervo de 109 cepas aisladas de suelo y raíz en cuatro condiciones fitosanitarias y previamente caracterizadas morfológica y culturalmente. Verano, 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 4. Frequency of species / complex in 25 isolates of *Fusarium* spp. selected from a collection of 109 isolates obtained from soil and root in four phytosanitary conditions and previously characterized morphologically and culturally. Summer, 2016. Los Altos, Jalisco.

podrición seca, y en J. María, Poncitlán y Atotonilco para marchitez (Figura 5 A). En plantaciones con agaves aparentemente asintomáticos, *IF* fue 0.49 y 0.42 para Atotonilco y J. María, respectivamente; mientras que en parcelas improductivas de Cuquío, Degollado y Tepatitlán, *IF* estuvo en el rango 0.37-0.58. Estos resultados muestran la amplia distribución de *Fusarium* y el riesgo epidémico que representa. Entre los hongos totales contabilizados en muestras de suelo se encontraron géneros con capacidad antagonista y supresiva como *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Bionectria* spp. y *Aspergillus* spp.

lower *FI* values ≤ 0.2 were associated with MO 3.3-5.4 (Figure 5C). Comparing contrasting counties: in Atotonilco, a plantation with a value of *FI*=0.95 was associated with dry rot and pH=6.18 and MO=3.16; whereas another plantation associated with wilting had that of *FI*=0.21 with pH=6.95 and MO=5.36. In J. María, a plantation associated with dry rot with a value of *FI*=0.51 was related to pH=5.57 and MO=2.34, and another one associated to wilt had one of *IF*=0.11 pH=6.57 and MO=2.48. This suggests that, although *FI* may be determined by other edaphic-biological factors, it is possible to establish pH:MO thresholds suppressive to *Fusarium* (Figure 6).

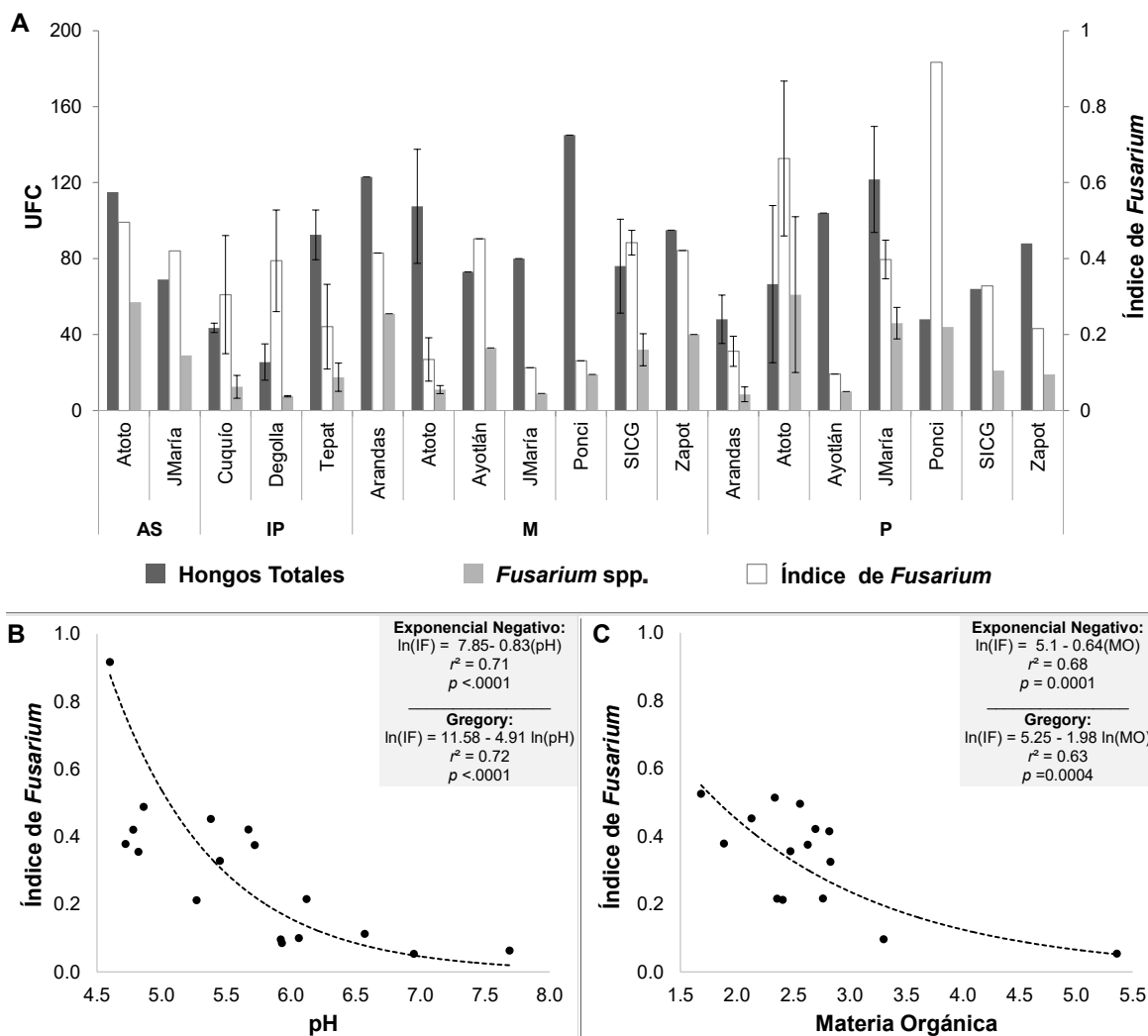


Figura 5. A) Unidades Formadoras de Colonias (UFC) e Índice de *Fusarium* obtenidas de 28 plantaciones comerciales de agave azul en cuatro condiciones fitosanitarias de 11 municipios de Los Altos, Jalisco. Barras de error indican desviación estándar. Ausencia de barras indican una muestra por municipio (Cuadro 1). Condición sanitaria: AS= Aparentemente sano, IP = Improductivo, M = Marchitez y P = Pudrición. B-C) Ajuste de nivel máximo de índice de *Fusarium* a modelos Exponencial Negativo y Gregory con respecto a pH del suelo (B) y Materia orgánica (C). Verano 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 5. A) Colony Forming Units (UFC) and *Fusarium* Index obtained from 28 commercial blue agave plantations in four phytosanitary conditions in 11 counties at Los Altos, Jalisco. Error bars indicate standard deviation. Absence of bars indicate a single sample per county (Table 1). Health condition: AS = Apparently healthy, IP = Unproductive, M = Wilt and P = Dry bud rot. B-C) Goodness-of-fit of *Fusarium* index maximum level to Exponential Negative and Gregory models with respect to soil pH (B) and Organic matter (C). Summer 2016. Los Altos, Jalisco.

IF tuvo una relación inversamente proporcional con pH de suelo y MO ($p \leq 0.02$). La tasa decremental de *IF* respecto al aumento de PH se estimó adecuadamente con el modelo exponencial negativo ($b=0.83$, $r^2=0.71$, $p<0.0001$) y Gregory ($b=4.91$, $r^2=0.72$, $p=0.0098$). Con estos modelos se estimó que $pH \leq 5.5$ es inductivo a *Fusarium* ($IF \geq 0.33$). El Índice de *Fusarium* más alto (0.92) se tuvo a un pH de 4.6 y el menor (0.1) en suelos neutro-alcalinos (6.9-7.7) (Figura 5B). Con respecto a MO, la tasa estimada fue ligeramente mejor con el modelo exponencial negativo ($b=0.64$, $r^2=0.68$, $p<0.0001$) que con Gregory ($b=1.98$, $r^2=0.63$, $p=0.0238$). Similarmente, se estimó que $MO \leq 2.5$ es inductivo a *Fusarium* ($IF \geq 0.30$). Así, los valores más bajos de $IF \leq 0.2$ se asociaron con MO 3.3 - 5.4 (Figura 5C). Comparando municipios contrastantes, en Atotonilco, una plantación con $IF=0.95$ estuvo asociada a pudrición seca con $pH=6.18$ y $MO=3.16$; mientras otra plantación asociada a marchitez tuvo $IF=0.21$ con $pH=6.95$ y $MO=5.36$. En J. María, una plantación asociada a pudrición seca con $IF=0.51$ estuvo relacionada con $pH=5.57$ y $MO=2.34$, y otra asociada a marchitez con $IF=0.11$ $pH=6.57$ y $MO=2.48$. Lo anterior sugiere que, aunque *IF* puede estar determinado por otros factores edáfico-biológicos, es posible establecer umbrales pH:MO supresivos a *Fusarium* (Figura 6).

DISCUSIÓN

La marchitez y pudrición seca del cogollo constituyen problemas fitosanitarios de alto riesgo productivo del agave azul (*Agave tequilana*) en la región DOT. El manejo fitosanitario de estas enfermedades actualmente es limitado en gran parte por restricciones etiológicas y epidemiológicas (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). En trabajos previos, la metodología etiológica ha sido regionalmente delimitada o se han enfatizado métodos

DISCUSSION

The wilt and dry bud rot constitute phytosanitary problems of high productivity risk in blue agave (*Agave tequilana*) in the DOT region. The phytosanitary management of these diseases is largely limited by etiological and epidemiological restrictions (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). In previous studies, the etiological approach has been regionally restricted or morphological and classical molecular methods based on ITSs have been emphasized with partial results (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). This is the first comprehensive regional work that involves epidemiological inductivity approaches in the selection of 40 commercial plantations in stages of productive stress of 3-4 years. The research included 11 counties at Los Altos, the main agave producing region of Jalisco with historical background of high epidemic intensity on these diseases (Acevedo-Sanchez *et al.*, 2017). Additionally, this work differentiated soil and root samples obtained at the focus and peripheral level from four predominant phytosanitary conditions: wilting, dry rot, seemingly healthy plantations and unproductive plots. The objective was to maximize and minimize regional and intra-plot variability, respectively, in the morphological, cultural and molecular characterization of *Fusarium* isolates associated to the agave. The conception of this approach considers previous evidence of the implication of *F. oxysporum* and *F. solani* on wilting (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) and *Fusarium* sp. on dry bud rot (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011) and was conceived assuming implication of a *Fusarium* species complex with contrasting interspecific parasitic fitness both, at regional and symptom level. This work demonstrated the association of five species with symptoms of wilting and / or dry rot located

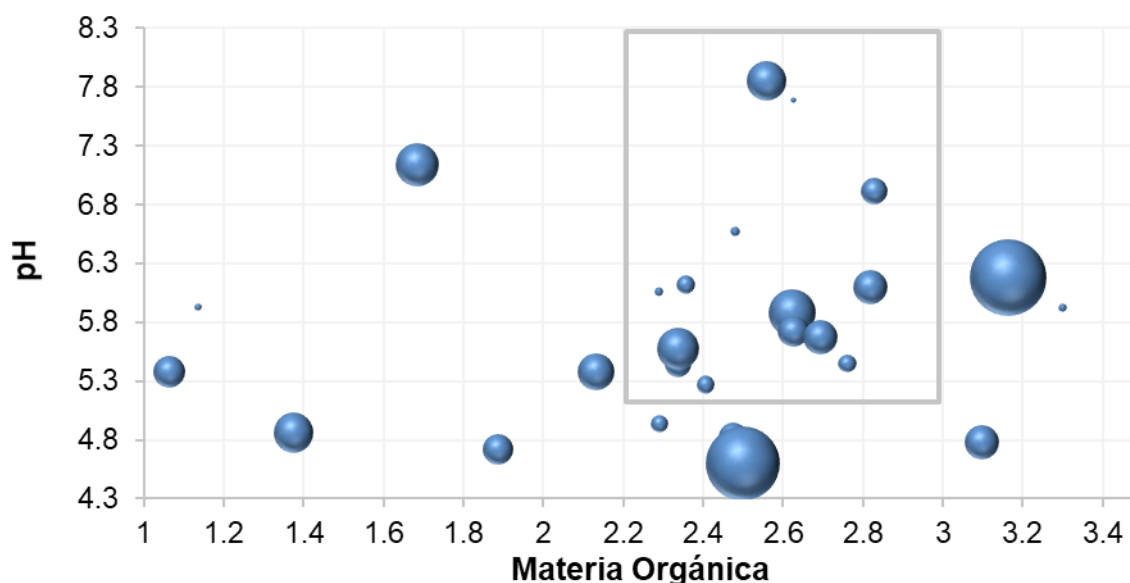


Figura 6. Relación de pH y MO en función al Índice de *Fusarium*. El recuadro muestra potencial umbral pH:MO asociado a bajos niveles de *IF*. El tamaño del círculo es proporcional al valor de *IF*. Verano 2016. Los Altos, Jalisco.

Figure 6. Relationship of pH and MO in function to *Fusarium* Index. The box shows a potential pH: MO threshold associated with low levels of *IF*. The size of the circle is proportional to the value of *IF*. Summer 2016. Los Altos, Jalisco.

morfológicos y moleculares clásicos basados en ITS con parciales resultados (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). Este es el primer trabajo exhaustivo regional que involucra el enfoque de inductividad epidemiológica en la selección de 40 plantaciones comerciales en edades de estrés productivo de 3-4 años. La investigación incluyó 13 municipios de Los Altos, principal región agavera de Jalisco, con antecedentes históricos de alta intensidad epidémica a estas enfermedades (Acevedo-Sánchez *et al.*, 2017). Adicionalmente, este trabajo diferenció muestras de suelo y raíz obtenidas a nivel de foco y perifoco provenientes de cuatro condiciones fitosanitarias predominantes: marchitez, pudrición seca del cogollo, plantaciones aparentemente sanas y parcelas improductivas. El objetivo fue maximizar y minimizar la variabilidad regional e intraparcular, respectivamente, en la caracterización morfológica,

in three phylogenetic complexes: *F. oxysporum* of the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) with 56% regional representativeness (46.2% soil y 66.7% root); *F. solani*, *F. falciforme* and *Fusarium* sp. of the *Fusarium solani* (FSSC) complex (40%); and *Fusarium* sp. of the *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) (4%). For the first time, the association of *F. falciforme* is reported, which was the only species associated to plantations with wilting, dry bud rot and unproductive condition, and two species still unidentified, one of them belonging to a complex without previously reported species in agave (FFSC). Root and soil isolates allowed analyze the results consistence due to the fungus association directly with host tissue. *F. falciforme* and *Fusarium* sp. (FSSC) were the only ones isolated only from soil. However, the former has already been found in aerial agave tissue in other Jalisco regions (CP-LANREF. Unpublished data).

cultural y molecular de *Fusarium* spp. asociados al agave. La concepción de este enfoque considera evidencias previas de la implicación de *F. oxysporum* y *F. solani* en marchitez (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017) y de *Fusarium* sp. en pudrición seca (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011) y se planteó asumiendo la asociación de un complejo de *Fusarium* spp. con adaptabilidad parasítica interespecífica, regional y sintomatológica, contrastante. Este trabajo demostró la asociación de cinco especies con síntomas de marchitez y/o pudrición seca ubicadas en tres complejos filogenéticos: *F. oxysporum* del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) con 56% de representatividad regional (46.2% suelo y 66.7% raíz); *F. solani*, *F. falciforme* y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium solani* (FSSC) (40%); y *Fusarium* sp. del complejo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (4%). Por primera vez se reporta la asociación de *F. falciforme*, única especie vinculada a plantaciones con marchitez, pudrición seca e improductivas, y dos especies aún sin identificar, una de ellas perteneciente a un complejo sin especies previamente reportadas en agave (FFSC).

Aislamientos de raíz y suelo permitieron analizar la consistencia de resultados al asociar al hongo directamente con tejido del hospedante. *F. falciforme* y *Fusarium* sp. (FSSC) fueron los únicos que se aislaron exclusivamente de suelo. Sin embargo, el primero se ha encontrado en tejido aéreo de agave en otras regiones de Jalisco (CP-LANREF. Datos no publicados). El análisis de secuencias y filogenia confirmó la variabilidad intra e interespecífica de *Fusarium* y la asociación de haplotipos, referidos aquí como variantes de secuencia intra-específicos con base en el gen EF-1a, con síntomas específicos. Claramente, marchitez se asoció con más haplotipos específicos a este síntoma pertenecientes a *F. solani*, *F. falciforme* y *F. oxysporum*. Este último fue la especie más diversa e incluyó

Sequence analysis and phylogeny confirmed the intra and interspecific variability of *Fusarium* and the association of haplotypes, referred to here as intra-specific sequence variants based on the *EF-1a* gene, with specific symptoms. Clearly, wilting was associated with more haplotypes specific to this symptom belonging to *F. solani*, *F. falciforme* and *F. oxysporum*. The later was more diverse and included the only haplotype associated exclusively to dry bud rot and the only one found in apparently healthy plantations. The existence of only one haplotype by complex associated only with dry bud rot or with the ability to cause both types of symptoms suggests an interspecific process of divergent evolution with adaptation to aerial symptoms, wilt being the parasitic condition associated to the ancestral specie(s). The occurrence of two unidentified species may involve advanced speciation or less likely, a convergent evolution process. The possibility of these population genetics processes is highly possible considering the continued and confined agave cultivation for more than 200 years and the agave semi-perennial condition with vegetative propagation. These adaptive mechanisms have been suggested in crops such as mango (*Mangifera indica*) given the increasing variability and occurrence of new *Fusarium* species (Liew *et al.*, 2016). In this context, it is concluded that the wilting and dry rot of the agave bud are symptomatic expressions of a syndrome caused by different *Fusarium* species with differential parasitic adaptability at the intra and interspecies level. One single isolate (haplotype) of *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. falciforme* can apparently cause wilt and dry bud rot but are not the most prevalent, which explain the low incidence of both symptoms at the same plant in the field. In total, these species have the highest numbers of isolates (haplotypes) specialized only to cause wilting, thus clarify the intense occurrence

el único haplotipo asociado exclusivamente a pudrición seca y el único encontrado en plantaciones aparentemente sanas. La existencia de un haplotipo, por complejo de especies, asociado únicamente con pudrición seca o con la capacidad de causar los dos tipos de síntomas sugiere un proceso interespecífico de evolución divergente con adaptación a síntomas aéreos, siendo marchitez la condición parasítica asociada a la especie(s) ancestral. La ocurrencia de dos especies no identificadas puede implicar procesos avanzados de especiación o la existencia, menos probable, de procesos de evolución convergente. La viabilidad de estos procesos genéticos poblacionales es posible considerando la continuada y confinada cultivación del agave por más de 200 años en región DOT y la condición semiperenne del cultivo con propagación vegetativa. Estos mecanismos adaptativos se han sugerido en cultivos como el mango (*Mangifera indica*) ante la creciente variabilidad y ocurrencia de nuevas especies de *Fusarium* (Liew *et al.*, 2016). Con este contexto, se concluye que la marchitez y la pudrición seca del cogollo del agave son expresiones sintomatológicas de un síndrome causado por diferentes especies de *Fusarium* con adaptabilidad parasítica diferencial a nivel intra e interespecie. La marchitez y pudrición seca puede ser causada por un mismo aislado (haplotipo) de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. falciforme* pero no son los más prevalentes, lo que explica la baja incidencia de ambos síntomas en la misma planta. Estas mismas especies tienen en conjunto un mayor número de aislados (haplotipos) especializados únicamente en marchitez siendo congruente con su alta intensidad epidémica regional. Esta conclusión requiere posteriores estudios de patogenicidad y epidemiología especializados, ampliar otras regiones agaveras DOT, muestreo de tejido aéreo, incluir mayor acervo de secuencias, y el empleo de otros genes como los asociados a RPB1 y RPB2 (O'Donnell *et al.*, 2015). Sin embargo, estos

and epidemic rates reported for this symptom (Rubio, 2007; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017).

These findings require further specialized epidemiological and pathogenicity studies, expanding other DOT agave regions, air tissue sampling, including more sequences, and the use of other genes such as those associated with *RPB1* and *RPB2* (O'Donnell *et al.*, 2015). However, these results contribute to the improvement of regional control and monitoring strategies by clarifying the etiology of the three types of bud rot (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014; Coria-Contreras *et al.*, 2019). To this respect, in this work and that conducted with grey spot at state level (Coria-Contreras *et al.*, 2019), the bacterial rot was never detected nor isolated from the field indicating a too low prevalence or occurrence only under specific agronomic and/or climatic condition (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014).

Regional etiological studies, in addition to an epidemiological approach (Ceja-Torres *et al.*, 2008), require methodological strategies to optimize time, economic resources and to provide a rational framework. This work shows the importance of combining morphological and classical cultural strategies with the current molecular approach (Leslie and Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2015; Gogoi *et al.*, 2017). The characterization of a total of 109 regional *Fusarium* isolates in five culture media allowed categorizing by groups and finally selecting the collection of representative strains for molecular identification (Burgess *et al.*, 1991; Leslie and Summerell, 2006). Previously determined as important for screening *Fusarium* isolates in PDA (Gogoi *et al.*, 2017), mycelial colorimetry was essential as an initial phase due to the large amount of initial cultures in Komada (248). On the other hand, due to the complexity of the etiological problem of this work, the ITS

resultados coadyuvan a mejorar estrategias de control y monitoreo regional al clarificar la etiología de los tres tipos de pudrición del cogollo (Gómez-Ortiz *et al.*, 2011; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Al respecto, en este trabajo y el realizado con mancha gris a nivel estatal (Coria-Contreras *et al.*, 2019), la pudrición bacteriana no fue detectada lo que supone su extremada baja prevalencia u ocurrencia en condiciones agronómicas y climáticas muy específicas (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Rincón-Enríquez *et al.*, 2014).

Estudios etiológicos regionales, además de un enfoque epidemiológico (Ceja-Torres *et al.*, 2008), requieren de estrategias metodológicas que permitan optimizar tiempo, recursos económicos y aporten a un marco racional de análisis. Este trabajo mostró la importancia de combinar estrategias morfológicas y culturales clásicas con el enfoque molecular actual (Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell *et al.*, 2015; Gogoi *et al.*, 2017). La caracterización de un total de 109 aislados regionales de *Fusarium*, en cinco medios de cultivo, permitió categorizar por grupos y finalmente seleccionar el acervo de cepas representativas para identificación molecular (Burgess *et al.*, 1991; Leslie y Summerell, 2006). La colorimetría micelial, importante atributo discriminante para *Fusarium* en PDA (Gogoi *et al.*, 2017), resultó fundamental como fase inicial debido al gran acervo de siembras iniciales en Komada (248). Por otro lado, debido a la complejidad del problema etiológico de este trabajo, la región ITS no fue funcional para la identificación de *Fusarium*. Vetrovsky y colaboradores (2016) indican que esta región no es adecuada por su alta variabilidad, su naturaleza multicopia y su longitud tan variable. Adicionalmente, ITS es una región altamente conservada para resolver límites interespecíficos de *Fusarium*. Por lo anterior, se estima que 50% de secuencias *Fusarium* o más, están incorrectamente

region was not functional for the identification of *Fusarium*. Vetrovsky and coworkers (2016) indicate that this region is not suitable due to its high variability, its multi-copy nature and its variable length. Additionally, ITS is a region highly conserved to resolve interspecific *Fusarium* boundaries. Therefore, it is estimated that 50% of *Fusarium* sequences or more are incorrectly identified at NCBI (O'Donnell *et al.*, 2015). These aspects are fundamental from the etiological and population genetic perspective due to the current relevance of *Fusarium*. In Mexico, recent studies show the importance of this genus in crops such as *Jatropha curcas*, *Capsicum pubescens* and *Citrus sinensis* (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2019; Parra-Cota *et al.*, 2019).

Although the *Fusarium* Index *IF* was highly variable between counties and plantation phytosanitary condition, *IF* is proposed as an indicator to relate fungus richness to *Fusarium* spp. to estimate soil suppressive condition under the assumption that sustainable management of *Fusarium*, a fungus with high saprophytic-parasitic capacity, should be based on prevention and promoting soil health. *IF* variability can be explained by its multifactorial determinant as evidenced by its inverse relationship with pH and MO ($r^2 = 0.72 - 0.68$). The inductive effect of *Fusarium* populations due to acid pH has been reported in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Huang *et al.*, 2019) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. In this case, pH lower than 5.2 was more inductive (Fang *et al.*, 2012). Similarly, a MO rich soil (i.e. greater than 3%) is widely accepted as a condition of suppressive soils that favors competition or inhibition of *Fusarium* spp. due to beneficial microorganisms (Orr and Nelson, 2018; Huang *et al.*, 2019). In this investigation, *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. frequently were found associated to agave plantations with

identificadas en NCBI (O'Donnell *et al.*, 2015). Estos aspectos son fundamentales desde la perspectiva etiológica y genética poblacional debido a la relevancia actual de *Fusarium*. En México, recientes estudios demuestran la importancia de este género en cultivos como *Jatropha curcas*, *Capsicum pubescens* y *Citrus sinensis* (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Almaraz-Sánchez *et al.*, 2019; Parra-Cota *et al.*, 2019).

Aunque el Índice *Fusarium* (IF) fue altamente variable entre municipios y condición fitosanitaria de plantación, IF se propone como indicador para relacionar riqueza de hongos respecto a *Fusarium* spp. para estimar la condición supresiva del suelo bajo la premisa que el manejo sustentable de *Fusarium*, hongo con alta capacidad saprobiótica-parasítica, se debe basar en la prevención promoviendo la salud del suelo. La variabilidad IF puede explicarse por su determinante multifactorial como lo evidenció la relación inversamente proporcional con pH y MO ($r^2 = 0.72 - 0.68$). El efecto inductivo de poblaciones de *Fusarium* con pH ácido se ha reportado en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Huang *et al.*, 2019) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. En este caso, pH menor a 5.2 fue más inductivo (Fang *et al.*, 2012). Similarmente, un suelo rico en MO (i.e. mayor a 3%) es una condición ampliamente aceptada de suelos supresivos que favorece poblaciones de microorganismos que compiten o inhiben el desarrollo de *Fusarium* spp. (Orr y Nelson, 2018; Huang *et al.*, 2019). En esta investigación, *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. frecuentemente se asociaron a plantaciones con bajo IF (CP-LANREF. Datos no publicados) lo que demuestra la necesidad de estudios integrales regionales. La propuesta de umbrales pH:MO en este trabajo tiene potencial para estimar riesgos productivos por *Fusarium* spp. en agave.

La diversidad, complejidad y prevalencia de especies de *Fusarium* en plantaciones comerciales

low IF (CP-LANREF. Unpublished data) which demonstrates the need for regional comprehensive studies. The pH:MO thresholds suggestion in this work has potential to estimate productive risks due to *Fusarium* spp. in agave.

The diversity, complexity and prevalence of *Fusarium* species in commercial plantations at Los Altos and the historical productive impacts caused by this fungus stimulate to investigate the wilt and dry bud rot syndrome with a comprehensive approach relating the pathosystem to physical-chemical soil variables, antagonists richness, climatic factors and crop management. This approach will allow effective preventive management strategies and sustaining soil health. Likewise, it will help to estimate and mitigate risks associated with *Fusarium* spp. due to the intense mobilization of vegetative planting material required for crop expansion upon demand on tequila exports, currently in fifth income place among Mexican agricultural commodities. Blue agave constitutes a valuable crop chain that justifies research and innovation investment to assure competitiveness and the socio-cultural and environmental preservation values.

CONCLUSIONS

This research provides for the first time exhaustive etiological information associated with wilting and dry bud rot of blue agave (*A. tequilana*) in 40 commercial plantations of 11 counties at Los Altos Jalisco. Morphological, cultural and molecular characterization of *Fusarium* spp. isolates associated with these symptoms allows unifying them as expressions of a syndrome caused by five species of *Fusarium* belonging to *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) and *F. fujikuroi* (FFSC) complexes. It is proposed to name this disease as

de Los Altos y los impactos productivos históricos causados por este hongo estimula investigar el síndrome marchitez y pudrición seca del cogollo desde una perspectiva sistémica, en la cual se considere el modelo planta-patógeno en relación a variables físico-químicas del suelo, riqueza biológica de antagonistas, factores climáticos y tipologías productivas. La comprensión sistémica permitirá desarrollar estrategias de manejo preventivas efectivas y sustentar la salud del suelo. Así mismo, coadyuvará a estimar y mitigar riesgos asociados a *Fusarium* spp. debido a la intensa movilización de hijuelos requerida por el incremento de superficie plantada ante la demanda de exportación de tequila, actualmente en quinto lugar en generación de divisas. El cultivo de agave azul constituye una cadena productiva que justifica inversión en investigación e innovación que garantice su rentabilidad y preservación socio-cultural y ambiental.

CONCLUSIONES

Esta investigación aporta por primera vez información etiológica exhaustiva asociada a la marchitez y pudrición seca del cogollo de agave azul (*A. tequilana*) en 40 plantaciones comerciales de 13 municipios de Los Altos, Jalisco. La caracterización morfológica, cultural y molecular de aislados de *Fusarium* spp. asociados a estos síntomas permite unificarlos como expresiones de un síndrome causado por cinco especies de *Fusarium* pertenecientes a los complejos *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) y *F. fujikuroi* (FFSC). Se propone denominar *marchitez y pudrición seca del cogollo* del agave a esta enfermedad. La marchitez y pudrición seca puede ser causada por un mismo aislado (haplotipo) de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. falciforme* pero, contrario a los que causan únicamente marchitez, no fueron los más prevalentes. *F.*

wilt and dry bud rot of agave. Wilt and dry bud rot can be caused by a single isolate (haplotype) of *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. falciforme* but, contrary to those that cause only wilting, they were not the most prevalent. *F. oxysporum* was the most variable and prevalent in soil (46.2%) and root (66.7%) suggesting greater parasitic fitness. *F. falciforme* and two unidentified species belonging to FSSC and FFSC complexes are reported for the first time associated with agave. Although, these results require greater precision through epidemiological and pathogenicity studies, the extensive nature of this work confers clear etiological trends. The *Fusarium* Index *IF* has potential as indicator of fungal richness respect to *Fusarium* spp. to estimate soil suppressive condition. A significant inverse relationship of *IF* with pH and MO was found, allowing to suggest an integrated threshold to estimate productive risks due to *Fusarium*. Finally, considering the official campaign against agave pests, these results justify use of independent wilt and dry bud rot diagrammatic scales for monitoring purposes. However, the inclusion of algorithms in the SIVEA digital system is recommended to automatize analysis of the syndrome regional incidence for risk analysis purposes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to CNRF-DGSV for the financial support through the SENASICA-CRT agreement for the execution of the SIVEA project. To COLPOS and CONACYT for the first author's master's degree scholarship. To Casa Herradura, Casa Sauza and CESAVEJAL for logistical support and/or infrastructure. To CP-LANREF team for its unconditional support in the development of this research. To Miranda Mora Gutiérrez for the English translation.

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



*oxysporum* fue el más variable y prevalente en suelo (46.2%) y raíz (66.7%) sugiriendo mayor adaptabilidad parasítica. *F. falciforme* y dos especies sin identificar de los complejos FSSC y FFSC se reportan por primera vez asociados al agave. Aunque, estos resultados requieren mayor precisión mediante estudios epidemiológicos y de patogenicidad, el carácter extensivo de este trabajo confiere claras tendencias etiológicas. El Índice *Fusarium* (IF) tiene potencial como indicador de riqueza de hongos respecto a *Fusarium* spp. para estimar la condición supresiva del suelo. IF tuvo una relación significativa inversamente proporcional con pH y MO, lo que permite proponer umbrales integrados para estimar riesgos productivos por *Fusarium*. Finalmente, considerando la campaña oficial contra plagas del agave, estos resultados justifican el empleo de escalas diagramáticas independientes para marchitez y pudrición seca del cogollo con fines de monitoreo. Sin embargo, se recomienda la inclusión de algoritmos en el sistema digital SIVEA para automatizar el análisis la incidencia regional del síndrome por tipología de síntoma con propósito de análisis de riesgo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNRF-DGSV por el apoyo financiero a través de convenio SENASICA-CRT para ejecución del proyecto SIVEA. Al COLPOS y CONACYT por la beca de maestría del primer autor. A Casa Herradura, Casa Sauza y CESAVEJAL por el apoyo logístico y/o infraestructura. Al equipo LANREF por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación. A Miranda Mora Gutiérrez por la traducción al inglés.

## LITERATURA CITADA

- Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, López-Bautista V, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, y Mora-Aguilera G. 2017. Criterios epidemiológicos para implementar una red de monitoreo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en regiones agaveras de Jalisco. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 176-177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Tlatilpa-Santamaría IF y Nieto-Angel D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 159-169. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-2>
- Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán-de Peña DA, Vera-Núñez JA and Peña-Cabriales J.J. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). Journal of the Professional Association for Cactus Development 12: 166-180. <https://pdfs.semanticscholar.org/b624/2327d0c870be2105ebda216325f241da3a7c.pdf>
- Burgess LW, Summerell BA and Nelson PE. 1991. An evaluation of several media for use in identification of some *Fusarium* spp. Australasian Plant Pathology 20: 86-88. <https://doi.org/10.1071/APP9910086>
- Ceja-Torres LF, Mora-Aguilera G, Téliz D, Mora-Aguilera A, Sánchez-García P, Muñoz-Ruiz C, Tlapal-Bolaños B y De La Torre-Almaraz R. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. Agrociencia 42(4): 451-461. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000400008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400008&lng=es&nrm=iso)
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(1): 71-94. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2017. Geografía de la DOT. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/> (consulta, enero 2017).
- Fang X, You MP and Barbetti MJ. 2012. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. European Journal of Plant Pathology 134: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0042-1>
- Gogoi M, Sarmah DK and Ali S. 2017. Cultural and morphological variations of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causing root rot of patchouli in Assam, India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(11): 1889-1901. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.225>
- Gómez-Ortiz P, Sánchez-Arizpe A, Virgen-Calleros G, Carvajal-Cazola CR, y Padrón-Corral E. 2011. Incidencia y severidad de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var. azul en la zona sur del estado de Nayarit, México. Agraria 8: 21-25. [http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/45/Agraria\\_2011\(8\)-2-3.pdf](http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/article/45/Agraria_2011(8)-2-3.pdf)
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Martínez-Bolaños M, Hernández-Arenas M y López-Guillén G. 2017. Primer

- registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 150-161. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1608-1>
- Huang J, Pang Y, Zhang F, Huang Q, Zhang M, Tang S, Fu H and Li P. 2019. Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. European Journal of Plant Pathology 154: 585-596. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01683-5>
- Jiménez-González LR, Mendoza-Ramos C, Santana-Peñaloza B, Coria-Contreras JJ, Delgado-Mora F, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E y Mora-Aguilera G. 2017. Escala logarítmica diagramática de severidad para medición de pudrición seca del cogollo, marchitez y mancha gris del agave azul. Revista Mexicana de Fitopatología 35(S): 177. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento352017.html>
- Jiménez-Hidalgo I, Virgen-Calleros G, Martínez-de la Vega O, Vandemark G and Olalde-Portugal V. 2004. Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. European Journal of Plant Pathology 110: 317-331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 388 pp.
- Liew ECY, Laurence MH, Pearce CA, Shivas RG, Johnson GI, Tan YP, Edwards J, Perry S, Cooke AW and Summerell BA. 2016. Review of *Fusarium* species in association with mango malformation in Australia. Australasian Plant Pathology 45:547-559. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0454-z>
- O'Donnell K, Ward T, Robert V, Crous P, Geiser D and Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. Phytoparasitica 43: 583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Orr R and Nelson PN. 2018. Impacts of soil abiotic attributes on *Fusarium* wilt, focusing on bananas. Applied Soil Ecology 132: 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.019>
- Parra-Cota FI, García-Pereyra J, Aviña-Martínez GN y de los Santos-Villalobos S. 2018. Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1): 193-201. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-3>
- Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Peña D and Ávila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protection Science 53: 144-152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar E, Qui-Zapata J, Vega-Ramos K y Uvalle-Bueno J. 2014. Selección de bacteriófagos para el control biológico del agente causal de la pudrición del *Agave tequilana*. Revista Mexicana de Fitopatología 32(S): 112. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Rubio CR. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. Pp:169-195. In: Domínguez PJF (ed.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona con denominación de origen del tequila. Libro técnico No. 4. INIFAP-CIRPAC. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. 196p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/630>
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agrícola y Pesquera. SAGARPA. <https://www.gob.mx/siap> (Consultado enero 2018).
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. Biochemical Genetics 51: 243-255. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>
- Vetrovsky T, Kolarik M, Zifcakova L, Zelenka T and Baldrian P. 2016. The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. Molecular Ecology Resources 16: 388-401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
- White TJ, Bruns T, Lee S and 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. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>