



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**RESPUESTA DE GENOTIPOS DE GARBANZO A LA
MARCHITEZ CAUSADA POR UN COMPLEJO DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL NOROESTE DE MÉXICO**

Por:

Carlos Iván Cota Barreras

TESIS APROBADA POR LA

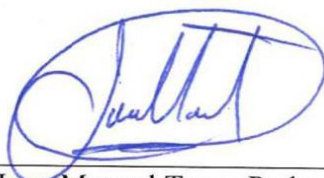
COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carlos Iván Cota Barreras, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Director de tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Integrante de comité de tesis



Dra. Josefina León Félix
Integrante de comité de tesis



Dr. Víctor Valenzuela Herrera
Integrante de comité de tesis

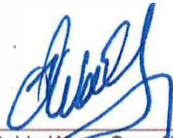
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Respuesta de Genotipos de Garbanzo a la Marchitez Causada por un Complejo de Hongos Fitopatógenos en el Noroeste de México” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Carlos Iván Cota Barreras, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por el apoyo brindado durante la estancia para poder culminar el doctorado.

Al Laboratorio de Fitopatología por su apoyo técnico y científico para poder cumplir con los objetivos planteados en el presente proyecto de investigación.

A mi director de tesis el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza por su confianza y apoyo durante este proceso. Además, le agradezco su tiempo y conocimiento que siempre manifestó, así como sus consejos.

Al Dr. Raymundo Saul García Estrada por su sinceridad desde que me recibió en el CIAD, su apoyo y su conocimiento aportado para las diferentes actividades realizadas durante mi estancia doctoral.

A la Dra. Josefina León Félix por sus valiosas contribuciones en las diferentes etapas del proyecto, en los diferentes escritos, su conocimiento y enseñanza en las diferentes materias en las cuales me impartió clases, como mostrar disposición para apoyarme.

Al Dr. Víctor Valenzuela Herrera por mostrarse siempre disponible para apoyarme y proporcionarme material para los diferentes experimentos realizados en el presente trabajo de tesis.

A mis amigos de laboratorio: Rosalía López Corrales, Alsino Wong Villarreal, Ricardo Vega Hernandez, Edén Guerrero Soto, Ana María López López, Alfonso Guerrero y también para mis amigos de generación Roberto Aguirre, Brisceida, Sara Aviles, Marilyn Criollo y Monica. A todos ellos gracias por ayudarme y hacerme una mejor persona.

A mis amigos Christian Navarro, Raul Calderon, Aldo y Hernan Plasencia, Jorge Palomino, Jorge Hodger, Edgar Moreno, Mario Sánchez, Luis Guevara, Ricardo Sevilla, Tarquino Soveranes, Armando y Jahir Castillejos, así como a Rocio González, Christian Morgan, Viridiana Lizarraga y July Grande por su sincera amistad y sus palabras de aliento.

DEDICATORIA

A mi esposa Dalinda Sánchez e hijas (Emma Victoria, Emilia Inés y Eileen Natalia) por todo el amor, cariño y motivación.

A mis padres: José de Jesús Cota Cruz y Josefina Barreras García por su amor incondicional en todo momento y apoyo en este proceso.

A mis hermanos Rommel de Jesús Cota Barreras y Victor Alejandro Cota Barrera por su gran cariño incondicional y por alentarme a seguir creciendo.

A cuñadas y sobrinos(as): Gloria Cervantes Carreón, Rommel Deodato, Ma. Del Rocío González Gutiérrez, Alondra y Regina por su cariño y los todos los momentos.

A mi tía María del Rosario Barreras García (Q. E. P. D) por su amor, por enseñarme a trabajar e incentivar a crecer.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. SINOPSIS	12
1.1. Justificación.....	12
1.2. Antecedentes.....	15
1.2.1. Importancia del Garbanzo.....	15
1.2.2. Enfermedades del Garbanzo	16
1.2.3. Enfermedades del Garbanzo Causada por Bacterias	16
1.2.4. Enfermedades del Garbanzo Causadas por Nematodos	17
1.2.5. Enfermedades del Garbanzo Causadas por Virus.....	17
1.2.6. Enfermedades del Garbanzo Causada por Hongos y Oomicetes.....	18
1.2.7. Importancia y Distribución de la Marchitez	18
1.2.8. Síntomas Causados por cada Fitopatógeno	20
1.2.9. Condiciones Favorables para el Desarrollo de la Enfermedad.....	21
1.2.10. Control Cultura de la Enfermedad.....	22
1.2.11. Control Biológico de la Enfermedad	22
1.2.12. Control Químico de la Enfermedad.....	23
1.2.13. Uso de Cultivares Tolerantes para el Manejo de la Marchitez.....	24
1.3. Hipótesis	24
1.4. Objetivo General	25
1.5. Objetivos Específicos	25
1.6. Sección Integradora del Trabajo.....	25
1.7. Referencias	27
2. MOLECULAR DETECTION, VIRULENCE, AND MYCELIAL COMPATIBILITY OF <i>Macrophomina phaseolina</i> ISOLATES ASSOCIATED WITH CHICKPEA WILT IN SINALOA Y SONORA, MEXICO	33
3. FIRST REPORT OF <i>Clonostachys chloroleuca</i> CAUSING CHICKPEA WILT IN MEXICO	43
4. FILOGENIA Y VIRULENCIA DE AISLADOS DE <i>Fusarium</i> SPP. Y <i>Neocosmospora falciformis</i> ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL GARBANZO EN EL NOROESTE DE MÉXICO	50

CONTENIDO (continuación)

5. RESPUESTA DE GENOTIPOS DE GARBANZO AL COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA MARCHITEZ	79
6. CONCLUSIONES GENERALES	91
7. RECOMENDACIONES	92

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Lotes comerciales de garbanzo con síntomas de marchitez en Sinaloa	20
2. Síntomas de amarillamiento y marchitez en plantas de garbanzo	21

RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial y México ocupa el décimo lugar en producción; En México, Sinaloa y Sonora son los principales estados productores. Este cultivo es susceptible a un gran número de enfermedades, dentro de ellas, la más importante es la marchitez causada por un complejo de hongos con origen en el suelo. Con base en lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente a los hongos causantes de la marchitez del garbanzo en campos de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, además de evaluar la respuesta de diversos genotipos de garbanzo a la infección por estos patógenos. Durante el ciclo 2018–2019, se recolectaron plantas de garbanzo con síntomas típicos de amarillamiento y marchitez en 40 lotes comerciales distribuidos en diversos municipios de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur. Se obtuvieron un total de 120 aislados fúngicos (29 de *Fusarium* spp., 15 de *Neocosmospora* sp., 4 de *Clonostachys* sp., 58 *Macrophomina* sp., 5 *Sclerotium rolfsii*, 5 *Rhizoctonia solani* y 4 de *Sclerotinia sclerotiorum*) asociados a las raíces sintomáticas. La identificación de especies de los aislados de *Fusarium*, *Neocosmospora* y *Clonostachys* se realizó mediante análisis filogenéticos con secuencias de fragmentos de los genes *TEF1- α* y *rpb2*; mientras que, para *Macrophomina* se utilizaron iniciadores específicos para un fragmento del gen *TEF1- α* . Las pruebas de patogenicidad y virulencia se llevaron a cabo mediante la inmersión de raíces de plantas de garbanzo con 15 días de edad de la variedad Blanco Sinaloa 92. Las raíces se colocaron en una suspensión de inóculo de cada uno de los aislados fúngicos. La evaluación de la respuesta a la enfermedad causada por los hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del garbanzo se realizó con 10 diferentes genotipos de garbanzo, siguiendo la misma metodología que la prueba de patogenicidad. Los resultados de la identificación filogenética mostraron que las especies identificadas fueron *Fusarium languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides*, *Neocosmospora falciformis* y *Clonostachys chloroleuca*. También, se identificó a *Macrophomina phaseolina* mediante el uso de iniciadores específicos. Respecto a las pruebas de patogenicidad, todos los aislados fúngicos usados en este estudio fueron patogénicos y presentaron diferencia en la virulencia. Asimismo, los 10 genotipos de garbanzo fueron susceptibles a todas las especies de hongos fitopatógenos, encontrando que *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* fueron los que indujeron mayor severidad de la enfermedad en todos los

genotipos.

Palabras clave: *Cicer arietinum*, complejo de especies, molecular, virulencia, genotipos, aislados.

ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the third most important legume worldwide and Mexico ranks tenth in production. In Mexico, Sinaloa and Sonora are the main producing states. This crop is susceptible to a large number of diseases, among them, the most important is the wilt caused by a complex of soil-borne fungi. The aims of this study were to characterize fungi causing chickpea wilt in fields of Sinaloa, Sonora, and Baja California Sur, as well as to evaluate the response of chickpea genotypes to the infection by these pathogens. During the 2018–2019 cycle, chickpea plants with typical symptoms of yellowing and wilting were collected in 40 commercial lots distributed in various municipalities of Sinaloa, Sonora, and Baja California Sur. A total of 120 fungal isolates (29 *Fusarium* spp., 15 *Neocosmospora* sp., 4 *Clonostachys* sp., 58 *Macrophomina* sp., 5 *Sclerotium rolfsii*, 5 *Rhizoctonia solani*, and 4 *Sclerotinia sclerotiorum*) associated with symptomatic roots were obtained. The species identification of the *Fusarium*, *Neocosmospora* and *Clonostachys* isolates was performed by phylogenetic analysis with partial sequences of the *TEFI- α* and *rpb2* genes; while for *Macrophomina* specific primers were used for a fragment of the *TEFI- α* gene. The pathogenicity and virulence tests were carried out by immersing the roots of 15-day-old chickpea plants cv. Blanco Sinaloa-92. The roots were placed in an inoculum suspension of each of the fungal isolates. The response to the disease caused by fungi associated with chickpea wilt was evaluated with 10 different chickpea genotypes, following the same methodology as the pathogenicity test. The results of the phylogenetic analysis showed that the identified species were *Fusarium languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides*, *Neocosmospora falciformis*, and *Clonostachys chloroleuca*. Also, *Macrophomina phaseolina* was identified through the use of specific primers. Regarding the pathogenicity tests, all the fungi isolated in this study were pathogenic and there was a difference in virulence. Likewise, the 10 chickpea genotypes were susceptible to all species of plant pathogenic fungi, finding that *S. rolfsii* and *S. sclerotiorum* induced the greatest severity of the disease in all genotypes.

Key word: *Cicer arietinum*, species complex, molecular, virulence, genotypes, isolates.

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la única especie cultivable del género *Cicer* y se produce principalmente en áreas áridas y semiáridas alrededor del mundo (Millan *et al.*, 2006; Korbu *et al.*, 2021). Esta leguminosa, es la tercera más importante después del frijol y chícharo (Fierro *et al.*, 2019; Faruk y Khatun, 2020; Shekhawat *et al.*, 2021), por ser una excelente fuente de proteína comestible de alta calidad, especialmente para la población desfavorecida (Korbu *et al.*, 2021), lo que hace del cultivo de una gran importancia para la seguridad alimentaria en países en desarrollo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Además, es bajo en grasa y sodio y es una excelente fuente de fibra tanto soluble como insoluble, así como de carbohidratos complejos, vitaminas y minerales (Ali y Terefe, 2021).

El cultivo de garbanzo es una excelente opción para incrementar la fertilidad del suelo, mediante la fijación del nitrógeno (Jendoubi *et al.*, 2017; Pachauri y Sikarwar, 2022); sin embargo, el rendimiento es obstruido críticamente por diversos factores bióticos y abióticos (Suresh *et al.*, 2022). Entre los factores abióticos que afectan al garbanzo se encuentran principalmente la salinidad y la sequía, así como el calor y el frío extremos (Bhar *et al.*, 2021). Por otra parte, los factores bióticos que afectan al garbanzo incluyen de una serie de agentes patógenos como son hongos, bacterias, virus, micoplasmas y nematodos (Dhawale y Dhale, 2021). En este sentido, se han registrado alrededor de 172 patógenos (67 hongos, 22 virus, 3 bacterias, 80 nematodos, micoplasmas y fitoplasma) infecciosos en todo el mundo que son dañinos para el garbanzo (Nandeeshha *et al.*, 2020; Dhawale y Dhale, 2021; Nandeeshha y Huilgol, 2021; Shekhawat *et al.*, 2021).

Entre las principales limitantes que afectan la producción del garbanzo a nivel mundial como en México, es principalmente la enfermedad de la marchitez, causada por un complejo de hongos fitopatógenos, entre los cuales se han reportado a: *F. oxysporum*, *F. solani*, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *R. solani*; entre los que destacan *F. oxysporum* y *F. solani* por ser predominantes (Trapero y Jiménez-Díaz, 1985; Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008; Paredes-Escalante *et al.*, 2009; Ávila-

Miramontes et al., 2015; Ortega-Murrieta et al., 2016; Fierros et al., 2019). Además, esta enfermedad ha sido reportada en regiones productoras de Asia, Africa, sur de Europa y America; este complejo de hongos reduce el rendimiento hasta en un 80% en México (Padilla-Valenzuela et al., 2008; Azevedo et al., 2017).

En general, las enfermedades causadas por hongos con origen en el suelo como son la marchitez por *Fusarium* (*F. oxysporum*) (Sunkad et al., 2021; Suresh et al., 2022), pudrición de raíz por *Macrophomina phaseolina* (Gaikwad et al., 2020; Basbagci y Dólar, 2022), pudrición del cuello ocasionada por *Sclerotium rolfsii* (Shahzaman et al., 2020; Babariya y Nath, 2021), la pudrición de raíz negra producida por *Fusarium solani* (Azevedo et al., 2017; Yogesh y Vandana, 2021) y el moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Sheshma et al., 2022a; Sheshma et al., 2022b) son los principales factores limitantes en la producción de garbanzo alrededor del mundo (Fierros-Leyva et al., 2019).

La enfermedad de marchitez, causada por *Fusarium* spp., está ampliamente distribuida en las áreas donde se cultiva garbanzo alrededor del mundo y se ha reportado en al menos en 33 países. El patógeno entra a través de las raíces y provoca pudrición al invadir el sistema vascular de la planta (Dandale et al., 2021), provocando la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad como son amarillamiento y marchitez de la planta (Hale et al., 2020).

La pudrición seca de raíz producida por *M. phaseolina* es una enfermedad emergente y una amenaza muy importante para la producción de garbanzo a nivel mundial. Esta enfermedad se presenta principalmente en floración tardía y en etapa de vaina. La planta afectada se marchita en forma progresiva hasta secarse completamente (Patidar et al., 2019). Los síntomas más comunes observados en las plantas de garbanzo son: amarillamiento en peciolo y folíolos., Inicialmente la clorosis presenta en la parte superior de la planta. Las hojas y tallos de las plantas afectadas adquieren primero un color amarillo y posteriormente son de color café. La raíz principal se torna oscura y con pudrición; además, las raíces muertas están frágiles y muestran dañada la corteza (Sharma et al., 2016).

La pudrición del cuello causada por *Sclerotium rolfsii* es una enfermedad devastadora (Kumari et al., 2020; Babariya y Nath, 2021), convirtiéndose más seria en etapa de plántula. Las plántulas afectadas se tornan amarillas y mueren, estas colapsan y muestran pudrición en la región del cuello y por debajo del mismo. Para el diagnóstico de la enfermedad, el signo del hongo incluye micelio blanco característico y esclerocios de color café que se extienden en el tejido infectado, así como

también en el suelo. Este patógeno sobrevive en material de plantas muertas y en el suelo en forma de esclerocios, los cuales germinan e infectan a plantas jóvenes, causando necrosis por el ataque a la pared celular (Kumari *et al.*, 2020).

La pudrición negra de la raíz causada por *Fusarium solani* es una de las enfermedades más severas en el cultivo de garbanzo, la cual puede causar pérdidas de rendimiento hasta de 80%, además presenta síntoma de marchitez y pudrición de raíz. En un inicio las plantas no presentan síntomas externos, pero sus raíces presentan manchas oscuras de pudrición en el tejido interno. Los principales síntomas de las plantas enfermas son retraso de crecimiento, amarillamiento, secado de hojas y oscurecimiento del haz vascular (Yogesh y Vandana, 2021). El sistema radical se pudre con la mayoría de las raíces finas destruidas (Harveson, 2011).

Sclerotinia sclerotiorum es un hongo fitopatógeno necrotrófico con un amplio rango de plantas hospedantes y es una de las especies causales de la enfermedad de la pudrición del tallo del garbanzo. Los síntomas incluyen marchitamiento y caída de hojas, pudrición blanda acuosa, lesiones secas sobre el tallo y ramas (Lamont y Bennett, 2019). Las lesiones usualmente se desarrollan dentro del tejido necrótico que posteriormente producen parches de micelio blanco esponjoso, el cual es el signo más obvio en plantas infectadas. Los esclerocios son formados típicamente dentro del tejido infectado, a menudo en la medula del tallo, pero pueden formarse en la superficie del tejido durante condiciones de alta humedad (Bolton *et al.*, 2006).

El manejo de la marchitez causada por *Fusarium* spp. es difícil a pesar de la rotación de cultivo o aplicación de fungicidas debido que es un patógeno ampliamente distribuido en el suelo, caso similar ocurre con *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* que no pueden ser controlados mediante el uso de fungicidas o estrategias físicas y culturales debido a su amplio rango de hospedantes y a que sobrevive en el suelo por largos periodos de tiempo en forma de esclerocios; por lo cual, el método con mayor efectividad, factible y económicamente viable, es el uso de genotipos tolerantes de garbanzo (Kumari y Ghatak, 2018; Patidar *et al.*, 2019; Dandale *et al.*, 2021; Sheshma *et al.*, 2022).

Fusarium oxysporum es considerado un complejo de diferentes especies indistinguibles por morfología. Varios miembros de linajes filogenéticos del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) son conocidos por causar enfermedades importantes como marchitez vascular en varias plantas de interés económico (Azevedo *et al.*, 2017).

El término de “complejo de especies” se introdujo como una manera de nombrar clados

filogenéticos (Yilmaz *et al.*, 2021). Otras especies de *Fusarium* impactantes en la agricultura incluyen *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, así como *Neocosmospora solani* (sin. *Fusarium solani*) y *Neocosmospora falciformis* (sin. *Fusarium falciforme*) (Sandoval-Denis *et al.*, 2018). El género *Neocosmospora* incluye hongos que se encuentran comúnmente en el suelo, restos de plantas, material vegetal vivo, aire y agua (Sandoval-Denis *et al.*, 2019). El complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC por su sigla en inglés) es uno de los complejos de especies más grande y mejor estudiados dentro del género que muestra varias ecologías, incluye al menos 50 especies distintas que se agrupan dentro de tres clados: americana, africana y asiática (Yilmaz *et al.*, 2021). La identificación de especies de *Macrophomina* por análisis morfológicos es considerado ineficiente, esto debido principalmente a la superposición de la dimensión de los caracteres entre especies (Santos *et al.*, 2020). El género *Macrophomina* hasta hace poco era representado por una sola especie, *Macrophomina phaseolina* y fue solo siguiendo un enfoque polifásico utilizando datos de múltiples genes de ADN y morfología, que una nueva especie, *M. pseudophaseolina* se distinguió de aislados previamente identificados como *M. phaseolina*. Actualmente, la distinción de especies de *Macrophomina* está basado en análisis filogenético multilocus de secuencias de la región del espacio transcrito interno (ITS), así como de fragmentos de los genes actina (*act*), β -tubulina (*β T*), calmodulina (*cal*) y factor de elongación de traducción (*TEF-1 α*) (Machado *et al.*, 2019).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Importancia del Garbanzo

Cicer arietinum es cultivada en al menos 60 países alrededor del mundo con una cantidad de producción de 17.2 millones de ton de un área de 17.8 millones ha en 2018 (FAOSTAT, 2020). Dentro de los 10 principales productores de garbanzo a nivel mundial se encuentra la India, con una producción de 11,080,000 ton, seguido de Turquía, Pakistán, Myanmar, Etiopía, Rusia, Australia, Irán, Canadá y EE. UU (FAOSTAT, 2022). Entretanto, México se ubica como decimo

productor a nivel mundial, con una producción de 125,823 ton y los principales estados productores de este cultivo son: Sinaloa, Sonora, Michoacán, Guanajuato, Baja California Sur, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Hidalgo y Querétaro. De ellos, Sinaloa es la principal entidad productora de garbanzo, en la cual nueve municipios generaron la totalidad del valor de la producción de la entidad con mil 238 millones de pesos, lo que representó el 65% del valor de la producción nacional (SIAP, 2021).

1.2.2. Enfermedades del Garbanzo

Se han registrado alrededor de 172 patógenos (67 hongos, 22 virus, 3 bacterias, 80 nematodos, micoplasmas y fitoplasma) infecciosos en todo el mundo que son dañinos para el garbanzo (Nandeeshya *et al.*, 2020; Dhawale y Dhale, 2021; Nandeeshya y Huilgol, 2021; Shekhawat *et al.*, 2021). No obstante, solo unos pocos tienen el potencial para devastar al cultivo. Algunas de las enfermedades son problemas persistentes en la producción del garbanzo en extensas áreas geográficas, mientras que otras son esporádicas en su aparición o endémicas en distribución. Las enfermedades con distribución limitada pueden ser económicamente importantes localmente; sin embargo, debido a los cambios en las prácticas culturales, la mano del hombre y el cambio climático, algunas de las enfermedades menores pueden convertirse en económicamente importantes (Nene *et al.*, 2012).

1.2.3. Enfermedades del Garbanzo Causadas por Bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias que se han reportado como causantes de daño en garbanzo son: el tizón bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *cassiae* y el cancro del tallo causado por *Pseudomonas andropogonis* (Caruso, 1984; Nene *et al.*, 2012). El tizón causado por *Xanthomonas* es una enfermedad menor reportada solamente en la India. Además, se han reportado pudriciones de raíces causada por *Pseudomonas radiciperda*, así como la enfermedad de la semilla

rosa causada por *Erwinia rhapontici* (Chen *et al.*, 2011).

1.2.4. Enfermedades del Garbanzo Causadas por Nematodos

Muchas especies de nematodos parásitos de plantas se han reportado en las raíces y rizosfera del garbanzo en las principales regiones cultivadas en el mundo. Sin embargo, solo ciertas especies de nematodos son considerados limitantes en la producción del garbanzo, causando un estimado de 14% de pérdidas anuales en rendimiento. Los síntomas causados por el ataque de nematodos son inespecíficos, y en gran medida son consecuencia de la interrupción de los procesos normales de crecimiento de las plantas; la absorción y translocación de agua y nutrientes (Castillo *et al.*, 2008). Los nematodos patógenos más importantes en el garbanzo incluyen a nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.), nematodos formadores de quistes (*Heterodera* spp.) y el nematodo reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (Siddiqui y Mahmood, 1994; Castillo *et al.*, 2008; Pradhan *et al.*, 2021).

1.2.5. Enfermedades del Garbanzo Causadas por Virus

Cerca de 22 virus se han reportado en garbanzo, pero solo algunos de ellos están ampliamente distribuidos y causan daño económico significativo. Los virus más importantes en garbanzo son: alfalfa mosaic virus, bean leaf roll virus, beet western yellows virus, chickpea chlorotic dwarf virus, cucumber mosaic virus y faba vean necrotic yellows virus (Kumar *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Kanakala y Kuria, 2019). Varios virus transmitidos por insectos se han asociado a enfermedades en garbanzo bajo condiciones de campo. Algunos transmitidos por áfidos, incluyen especies dentro de las familias *Bromoviridae*, *Luteoviridae*, *Nanoviridae* y *Potyviridae*; mientras que, los transmitidos por mosca blanca, como es el caso de virus de la familia *Geminiviridae*, pueden conducir a pérdidas económicas significativas (Kanakala y Kuria, 2019).

1.2.6. Enfermedades del Garbanzo Causada por Hongos y Oomicetes

Entre las enfermedades fúngicas que impactan la producción del garbanzo están la marchitez y amarillamiento por *Fusarium* spp., pudrición seca de la raíz por *Macrophomina phaseolina*, pudrición de raíz por *Rhizoctonia solani*, pudrición del cuello por *Sclerotium rolfsii*, tizón o rabia por *Ascochyta rabiei*, moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, pudrición de semilla o damping off por *Pythium* spp., pudrición de raíz por *Phytophthora* spp., y moho gris por *Botrytis* spp. (Jiménez-Fernández *et al.*, 2011; Moparthi *et al.*, 2020; Bekele *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Dron *et al.*, 2022; Sheshma *et al.*, 2022b).

1.2.7. Importancia y Distribución de la Marchitez

Entre las principales limitantes en la producción de garbanzo están las pudriciones en raíces y marchitez (Figura 1) producidas por un complejo de hongos con origen en el suelo, entre ellos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Fierros-Leyva *et al.*, 2019). Este complejo fúngico puede reducir el rendimiento hasta el 80% (Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008).

A continuación, se describe la importancia y distribución cada uno de los hongos fitopatógenos asociados al complejo causante de la marchitez del garbanzo:

La marchitez por *Fusarium* spp. es una enfermedad seria en Pakistán, Nepal, Burma, España y México. Esta enfermedad causa hasta 61% de daño en etapa de plántula y puede causar cerca de 43% de daño en etapa de floración. Por otra parte, durante la etapa vegetativa y reproductiva, la enfermedad reduce la producción del cultivo al disminuir el rendimiento y el peso de la semilla. Las pérdidas anuales de la enfermedad se estimaron en aproximadamente de 10 al 15% en India y España, de un 40% en Túnez, pero hasta 70% de la pérdida del cultivo puede ocurrir en años con epidemias severas (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015; Fatima *et al.*, 2022).

La pudrición de la raíz causada por *M. phaseolina* se presenta comúnmente en etapa de floración tardía y formación de vaina, y la planta afectada se marchita, muere y permanece completamente

seca. Este hongo fitopatógeno puede causar pérdidas anuales de 10 a 20% en el rendimiento (Manjunatha y Saifulla, 2018; Patidar *et al.*, 2019). Asimismo, se ha observado que la incidencia de la enfermedad es más alta 86.6% en suelos arenosos comparado con suelos arcillosos (61.6%) y puede alcanzar hasta el 100% de pérdidas en variedades susceptibles bajo condiciones favorables para el patógeno. La pudrición de raíz por *M. phaseolina* están ampliamente distribuida en regiones cultivadas de garbanzo como en el sur de Asia, África, Irán, México, EE. UU y España (Rai *et al.*, 2022).

La pudrición negra causada por *F. solani* es una enfermedad que se ha reportado en Argentina, Chile, India, México, España, Siria y EE. UU (Nene *et al.*, 2012). Yogesh y Vandana mencionaron que esta enfermedad es seria, la cual puede causar pérdidas en rendimiento de hasta 80%, además, la enfermedad se puede presentar en cualquier etapa fenológica del cultivo.

La pudrición de la raíz causada por *R. solani* se ha registrado en varios partes de mundo incluyendo India, Pakistán, Turquía, Túnez, Canadá y Polonia (Al-Noman y Ibrahim, 2020). Se presenta comúnmente en etapa de plántula (hasta seis semanas después de la siembra) y en garbanzos bajo diferentes esquemas de riego, la enfermedad se puede presentar en etapas tardías (Nene *et al.*, 2012).

La pudrición del cuello causada por *S. rolfsii* es una enfermedad devastadora convirtiéndose más seria en etapa de plántula y está presente en cada región donde se siembra garbanzo. Es una amenaza seria en garbanzo ya que puede causar de 55 a 95 % de mortalidad de plantas en el cultivo bajo condiciones ambientales favorables para el patógeno (Akram *et al.*, 2008; Nene *et al.*, 2012; Babariya y Nath, 2021).

La pudrición del tallo causada por *S. sclerotiorum* puede causar hasta 100% de pérdidas en rendimiento en el cultivo de garbanzo y se considera uno de los hongos fitopatógenos más devastadores y distribuidos alrededor del mundo (Bolton *et al.*, 2006; Mwape *et al.*, 2021).

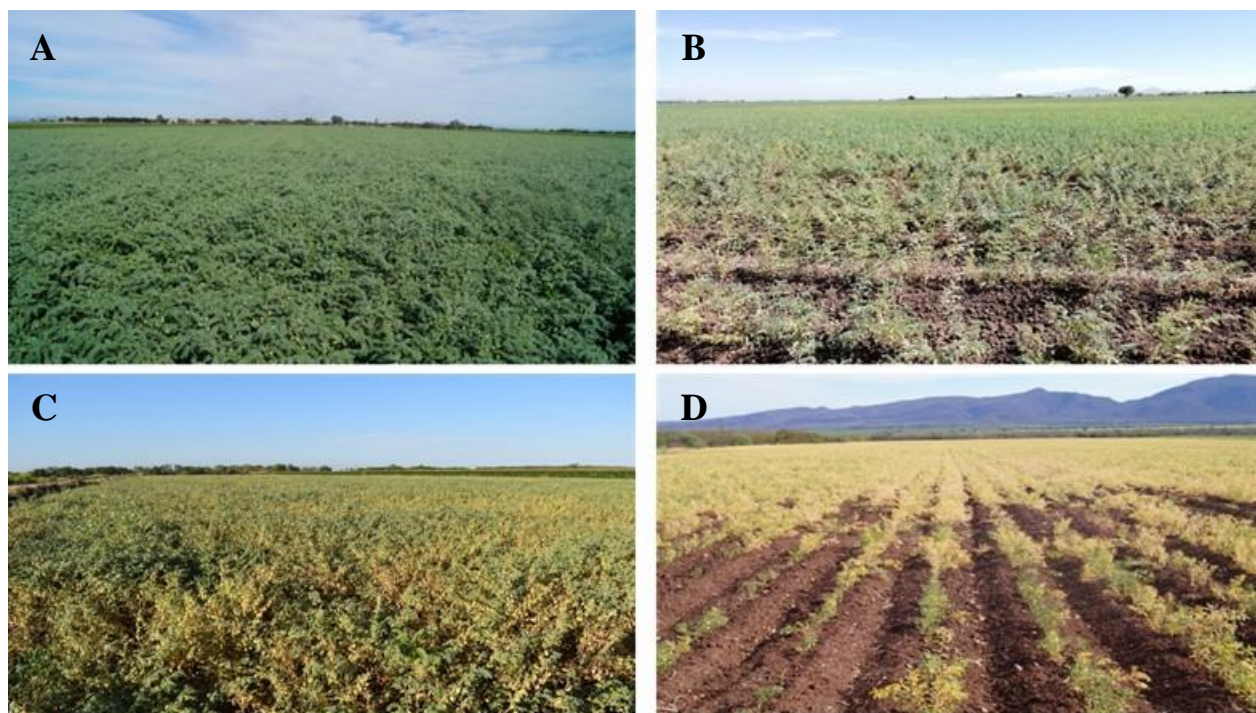


Figura 1. Lotes comerciales de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez en Sinaloa, México. **(A)** Lote comercial de garbanzo sin síntomas de marchitez. **(B)** Lote con 20% de incidencia de marchitez. **(C)** Lote con 60% de incidencia de la enfermedad. **(D)** Lote con síntomas severos de marchitez.

1.2.8. Síntomas Causados por cada Fitopatógeno

Los síntomas que mayormente presenta el cultivo de garbanzo al ser infectado por el complejo de hongos (*Fusarium* spp., *M. phaseolina*, *Neocosmospora* spp., *R. solani*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*) con origen en el suelo son: amarillamiento tanto de planta como de hojas, así como caída de hojas secas (Figura 2). Para el caso de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora* spp., no se observa pudrición en la parte externa de la raíz, además hay presencia de hifas y micelio en xilema de la planta, colonizando el sistema vascular del hospedante. En el caso de *M. phaseolina*, además de los síntomas anteriormente mencionados, hay un desprendimiento del tejido cortical de la parte baja del tallo y de la raíz principal que pueden resultar en la muerte prematura de la planta; asimismo, la apariencia gris en estos tejidos es debido a la abundante formación de microesclerocios. En el caso de *S. rolfsii*, este patógeno afecta principalmente a las plántulas, observándose pudrición en

la región del cuello y colapso de las mismas. Finalmente, *S. sclerotiorum* provoca daño en tallos y las lesiones se desarrollan dentro del tejido necrótico que posteriormente desarrollan micelio blanco (Bolton *et al.*, 2006; Lamont y Bennett, 2019; Hale *et al.*, 2020; Babariya y Nath, 2021; Dandale *et al.*, 2021; Marquez *et al.*, 2021; Yogesh y Vandana, 2021).



Figura 2. Síntomas de amarillamiento y marchitez en plantas de garbanzo. (A) Daño en raíz causada por los hongos fitopatógenos. (B) Síntoma de amarillamiento en planta de garbanzo. (C) Síntoma de marchitez en planta de garbanzo. (D) Muerte prematura de planta de garbanzo.

1.2.9. Condiciones Favorables para el Desarrollo de la Enfermedad

El desarrollo de marchitez causada por *Fusarium oxysporum sensu lato*, en garbanzo puede estar influenciada por la virulencia del patógeno, densidad de inoculo y condiciones ambientales, dado que las altas temperaturas son críticas para el desarrollo de la marchitez y la severidad de la

enfermedad es más alta a 25 y 30°C que a 15 a 20°C (Nene *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011). En el caso de *M. phaseolina*, este hongo puede causar pérdidas en rendimiento en altas temperaturas (30–35°C) y baja humedad (< 60%) del suelo (Sharma *et al.*, 2016; Márquez *et al.*, 2021). *Rhizoctonia solani* se puede ver en las primeras etapas fenológicas del cultivo, cuando la humedad del suelo es alta y puede causar infección en cada etapa de crecimiento de una planta (Basbagci *et al.*, 2019). *Sclerotium rolfsii* es importante en áreas donde la plántula está expuesta a altas temperatura (25–30°C) y alta humedad en el suelo (Srividya *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2022). En el caso de *S. sclerotiorum*, la enfermedad es favorecidas por temperaturas debajo de los 28°C y condiciones de humedad superficial continua por 40–112 h (Willbur *et al.*, 2019).

1.2.10. Control Cultural de la Enfermedad

Los factores ambientales como temperatura, nutrientes y pH del suelo pueden influir significativamente el desarrollo de la marchitez, una elección apropiada de prácticas culturales que aprovechen dicha influencia puede contribuir a un buen manejo de la enfermedad. Diversos autores mencionan que la manipulación de la fecha de siembra es una opción para evitar condiciones climáticas calientes en el momento de la maduración del cultivo. Además, se recomienda labranza profunda para reducir la densidad de inóculo en el suelo, ya que con este método se remueve las plantas secas infectadas como fuente inóculo, así como las estructuras de resistencia como son los esclerocios y clamidosporas. Otra práctica es la solarización, la cual es efectiva para el control de la enfermedad (Punja, 1985; Kamal *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016; Jendoubi *et al.*, 2017; Sunkad *et al.*, 2019).

1.2.11. Control Biológico de la Enfermedad

El uso de microorganismos para suprimir enfermedades de las plantas fue observado hace casi un siglo, y desde entonces se ha intentado aplicar agentes de control biológico naturales para el manejo de importantes enfermedades en plantas. Se han examinado una amplia gama de microorganismos

recuperados de la rizosfera, filosfera, esclerocios y otros hábitats para detectar antagonismo de agentes potenciales de control biológico. La competencia en la rizósfera por parte del antagonista por la fuente de alimentos y nutrientes es muy importante por su antagonismo contra varios patógenos de plantas con origen en el suelo. Se ha demostrado que la detección de organismos antagonísticos en el suelo o en el tejido vegetal, en lugar de medios de nutrientes artificiales predice mejor el potencial del agente, ya que los ensayos de campo son costosos y poco prácticos para un gran número de aislados. Diversos estudios han reportado el uso de diferentes agentes de control biológico contra los patógenos asociados a la marchitez del garbanzo, incluyendo a *Trichoderma* spp. *pseudomonas flourescens*, *Bacillus subtilis*, entre otros (Punja, 1985; Kamal *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016; Jendoubi *et al.*, 2017; Sunkad *et al.*, 2019).

1.2.12. Control Químico de la Enfermedad

El tratamiento a la semilla con fungicida es efectivo hasta cierto punto para reducir las pérdidas por marchitez en cultivos que son particularmente vulnerables en etapa de plántula. Diversos estudios han reportado el uso de carboxin + thiram (tratamiento a la semilla y experimento *in vitro*) para controlar a *Fusarium oxysporum*, *M. phaseolina* y *S. rolfsii*; mientras que, para *S. sclerotiorum* se ha reportado aplicaciones foliares de fungicidas para su control. Cabe mencionar que, la eficiencia de los fungicidas foliares depende de varios factores, incluido el momento de aplicación, la fenología del cultivo, las condiciones climáticas, el ciclo de la enfermedad, la cobertura de la aspersión y la duración de la protección (Kamal *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016; Shirsole *et al.*, 2019; Sunkad *et al.*, 2019; Pawar *et al.*, 2021). Actualmente, syngenta cuenta con dos productos Vibrance® (sedaxane + metalaxil + fludioxonil) y Cruiser Maxx® (fludioxonil + metalaxil + thiametoxam) y la empresa Bayer cuenta con Trilex® (penflufen + trifloxystrobin + metalaxil) para tratamiento de semilla para combatir enfermedades transmitidas por semilla y suelo como son: *R. solani*, *Fusarium* spp., y *Pythium* spp., así como a *Botrytis* y *Ascochyta*.

1.2.13. Uso de Cultivares Tolerantes para el Manejo de la Marchitez

El manejo de la marchitez causada por *Fusarium* es difícil a pesar de la rotación de cultivo o aplicación de fungicidas, caso similar ocurre con *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* que no pueden ser controlados mediante el uso de control químico, físico y cultural debido a su amplio rango de hospedantes, además que sobreviven en el suelo por largos periodos de tiempo en forma de esclerocios, por lo cual, el método con mayor efectividad, factible y económicamente viable, es el uso de genotipos de garbanzo tolerantes (Kumari y Ghatak, 2018; Patidar *et al.*, 2019; Dandale *et al.*, 2021; Sheshma *et al.*, 2022a).

El entendimiento de la resistencia genética para la identificación de fuentes de resistencia contra los patógenos es muy importante. Diversos estudios se han llevado a cabo para buscar fuentes de resistencia a *F. oxysporum* (Yadav y Kumar, 2019), *M. phaseolina* (Al-Taae *et al.*, 2021), *S. sclerotiorum* (Mwape *et al.*, 2021) y *S. rolfsii* (Vishruta y Nath, 2021) en genotipos de *Cicer* spp., sin embargo, únicamente se han encontrado algunos genotipos de garbanzo con cierta tolerancia a *F. oxysporum* (Yadav y Kumar, 2019).

1.3. Hipótesis

1. *Fusarium* spp. y *Macrophomina* spp., son los principales hongos causantes de la marchitez del garbanzo en el noroeste de México.
2. Todos los hongos asociados a los síntomas de marchitez son patogénicos, y existe diferencia en la virulencia de los diferentes aislados de los hongos.
3. Al menos dos grupos de compatibilidad vegetativa se encontrarán en los aislados de *M. phaseolina* asociados a la enfermedad.
4. Al menos un genotipo de garbanzo presentará tolerancia al complejo de hongos los causantes de la marchitez.

1.4. Objetivo General

Caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente a los hongos asociados a la marchitez del garbanzo en Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, así como evaluar la respuesta de los diversos genotipos a la infección por estos patógenos.

1.5. Objetivos Específicos

1. Determinar la identidad de las especies de hongos asociados al complejo de la marchitez mediante análisis filogenéticos usando secuencias de ADN.
2. Determinar la patogenicidad y virulencia de los hongos asociados al complejo de la marchitez en un genotipo de garbanzo susceptible.
3. Caracterizar morfológicamente a los aislados representativos de cada una de las especies de hongos causantes de la marchitez del garbanzo.
4. Determinar los grupos de compatibilidad vegetativa de los aislados de *Macrophomina phaseolina*.
5. Evaluar la respuesta de 10 genotipos de garbanzo al complejo de hongos causantes de la enfermedad.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

En esta tesis se incluyen cuatro artículos de investigación, de los cuales: el primero ya fue publicado, el segundo ya se envió a la revista, el tercero y cuarto están en preparación para enviarse a las revistas pertinentes. El primer artículo se publicó en Canadian Journal of Plant Pathology y se identificaron aislados de *Macrophomina phaseolina* obtenidos de diversos muestreos dirigido en plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez en el ciclo 2018-2019 en lotes

comerciales de Sinaloa y Sonora. Las muestras se llevaron al laboratorio de Fitopatología de CIAD, Coordinación Regional Culiacán, en donde se aislaron, purificaron y conservaron. Posteriormente se realizó la identificación molecular de estos aislados usando iniciadores específicos del gen *TEF1- α* , además se realizaron las pruebas de patogenicidad y virulencia mediante inmersión de raíces de plántulas cv. Blanco Sinaloa 92 en una suspensión micelial de los aislados previamente identificados. Finalmente, se realizaron ensayos para determinar los grupos de compatibilidad vegetativa de 58 aislados y se determinaron seis grupos de compatibilidad vegetativa entre los aislados. Este artículo aporta información relevante para cumplir con el objetivo general, ya que se hace una caracterización molecular y patogénica de la especie *M. phaseolina*, lo cual cumple en parte con los objetivos 1, 2 y 4 de esta tesis.

El segundo artículo cumplió con los objetivos 1, 2 y 3 en la presente tesis. Este se envió a la revista *New Disease Reports*. Se realizaron diversos muestreos dirigidos en plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez en el ciclo 2018-2019 en lotes comerciales de Sinaloa y Baja California Sur, de las cuales se realizaron pequeños cortes para aislar, purificar y conservar los aislados fúngicos. Posteriormente, se realizó la identificación molecular de los aislados usando secuencias de ADN de un fragmento del gen *TEF1- α* y la región espaciadora interna (*ITS*), y esta identificación se complementó con información de las características morfológicas. Además, se realizó prueba de patogenicidad y virulencia mediante inmersión de raíces de plántulas cv. Blanco Sinaloa 92 en una suspensión micelial de los aislados previamente identificados.

El tercer artículo cumplió con los objetivos 1, 2 y 3. Actualmente, se encuentra en preparación para ser enviado a la revista de *Plant Disease*. Se realizaron muestreos dirigidos en plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez en el ciclo 2018-2019 en lotes comerciales de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur. Se identificaron aislados pertenecientes a *Fusarium* spp. y *Neocospora falciformis* mediante análisis filogenético usando secuencias de ADN de fragmentos de los genes *TEF1- α* y *rpb2*, se complementó la información de estas especies con sus características morfológicas. Además, se realizaron pruebas de patogenicidad y virulencia mediante inmersión de raíces de plántulas cv. Blanco Sinaloa 92 en una suspensión micelial de los aislados previamente identificados.

El cuarto artículo cumplió con el objetivo 5, este artículo se encuentra en preparación para ser enviado a la *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. En este artículo se utilizaron dos aislados: uno de virulencia alta y uno de virulencia baja, de cuatro especies de hongos fitopatógenos

asociados al complejo causante de la marchitez en garbanzo, los cuales fueron: *Fusarium languescens*, *M. phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Se evaluó la respuesta de 10 genotipos diferentes de garbanzo contra las especies de hongos anteriormente mencionados, mediante la inmersión de raíces en suspensión micelial. Los resultados señalan que los aislados de virulencia mostraron diferencia significativa, que las especies de *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* fueron más virulentas que *F. languescens* y *M. phaseolina*. Finalmente, todos los genotipos de garbanzo mostraron susceptibilidad a las especies de hongos fitopatógenos.

1.7. Referencias

- Akram, A., Muhammad, I. S. H., Aleem, R. Q and Abdul, C. R. 2008. Variability among isolates of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of chickpea in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40(1): 453–460.
- Al-Noman, D. A. A and Ibrahim, B. Y. 2020. Defence enzymes induction in chickpea genotypes treated with *Trichoderma harzianum* T-22 against *Rhizoctonia solani*. *EurAsian Journal of BioSciences* 14(1): 7495–7500.
- Al-Taae, A. L., Al-Taae, H. H. W and Al-Jobory, S. A. E. 2021. Screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties against *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 22(8):114–120.
- Ali, B and Terefe, H. 2021. Spatial distribution and characterization of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) of chickpea in Northern Shoa, Ethiopia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 54(19-20): 1578–1602. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1929689>
- Azevedo, D. M. Q., Rocha, F. S., Costa, C. A., Pfenning, L. H., Da Costa, S. S., Melo, M. P., Da Silva, J. G., Fernanades, M. F. G. 2017. Etiology of root rot and wilt disease of chickpea in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 42:273–283.
- Avila-Miramontes, J. A., Padilla-Zaldo, G., Martinez-Heredia, D., Rivas-Santoyo, F. J., Coronado-Espéricueta, M. A y Ortega-Murrieta, P. F. 2015. Respuesta de algunos componentes del rendimiento del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación de *Mesorhizobium ciceri*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la región agrícola de la costa de Hermosillo. *Biotecnia* 17(3): 3–8.
- Babariya, V. D and Nath, K. 2021. Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes against Collar Rot Disease Caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of Experimental Agriculture International* 43(6): 9–18 DOI:10.9734/JEAI/2021/v43i630697
- Basbagci, G., Unal, F., Uysal, A and Dólar, F. S. 2019. Identification and pathogenicity of

- Rhizoctonia solani* AG-4 causing root rot on chickpea in Turkey. Spanish Journal of Agricultural Research 17(2):1–12.
- Basbagci, G and Dólar, F. S. 2022. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Rhizoctonia bataticola* isolates causing dry root rot of chickpea in Turkey, Archives of Phytopathology and Plant Protection 55(6): 720–735.
- Bekele, D., Tesfaye, K., Fikre, A and Cook, D. R. 2021. The extent and association of chickpea *Fusarium* wilt and root rot disease pressure with major biophysical factors in Ethiopia. Journal of Plant Pathology 103(1): 409–419.
- Bhar, A., Jain, A and Das, S. 2021. Soil pathogen, *Fusarium oxysporum* induced wilt disease in chickpea: a review on its dynamicity and possible control strategies. Proceedings of the Indian National Science Academy 87(1): 260–274.
- Bolton, N. D., Thoma, P. H. J and Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: Biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology 7(1): 1–16.
- Caruso, F. L. 1984. Bacterial blight of chickpea incited by *Pseudomonas andropogonis*. Plant Disease 68: 910–913.
- Castillo, C., Navas-Cortes, J. A., Landa, B. B., Jimenez-Díaz, R. M and Vovlas, N. 2008. Plant-Parasitic Nematodes Attacking Chickpea and Their In Planta Interactions with Rhizobia and Phytopathogenic Fungi. Plant Disease 92(6): 840–853.
- Chen, W., Sharma, H. C and Muehlbauer, F. J. 2011. Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. American Phytopathological Society. 164 p. ISBN: 978-0-89054-383-2.
- Dandale, S., Mane, S. S., Ingle, S. T., Jadhav, P. V., Patil, A. N., Nandanwal, R. S., Jankar, K. B., Tatte, R. R and Kalane, P. N. 2021. Pathogenic variability among specific isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing chickpea wilt. The Pharma Innovation Journal 10(6): 20–28.
- Dhawale, S. N and Dhale, D. A. 2020. Effects of *Fusarium* wilt on chickpea in India: A review. International Journal of Botany Studies 6(4): 884–890.
- Dron, N., Simpfendorfer, S., Sutton, T., Pengilly, G., Hobson, K. 2022. Cause of Death: *Phytophthora* or Flood? Effects of Waterlogging on *Phytophthora medicaginis* and Resistance of Chickpea (*Cicer arietinum*). Agronomy 12(89): 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010089>
- FAOSTAT. 2020. Disponible en línea: <http://www.fao.org/faostat/> (consultado en 11 de mayo de 2022).
- FAOSTAT. 2022. Disponible en línea: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> (consultado 11 de mayo de 2022).
- Faruk, M. I and Khatun, F. 2020. Development of eco-friendly management packages against foot and root rot and wilt diseases of chickpea. International Journal of Agricultural Science Research 8(1): 001–009.
- Fatima, K., Habib, A., Sahi, S. T and Cheema, H. M. N. 2022. Integrated management of *Fusarium* spp. associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) wilt disease in the punjab, pakistan. Applied Ecology and Environmental Research 20(1): 527–541

- Fierro, M., Palmieri, D., De Curtis, F., Vitullo, D., Rubio, J., Gil, J., Lima, G and Millan, T. 2019. Genetic and agronomic characterization of chickpea landraces for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytopathologia Mediterranea* 58(2): 239–248. doi:10.14601/Phytopathol_Mediter-10612.
- Fierros-Leyva GA, Acosta-Gallegos JA, Ortega-Murrieta PF, Padilla-Valenzuela I, Álvarez-Bravo A, Ramírez-Soto M, Velarde-Félix S. 2019. Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(1):131–142. doi:10.29312/remexca.v10i1.1730.
- Gaikwad, P. A., Dhutraj, D. N and Ambadkar, C. V. 2020. Cultural and genetic diversity of *Rhizoctonia bataticola* isolates causing dry root rot of chickpea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9(4): 981–996.
- Hale, S. M., Patil, M. G and Mali, R. V. 2020. Cultural, morphological and pathogenic variability among the different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9(6): 613–619.
- Harveson, R. M. 2011. Soilborne root diseases of chickpea in Nebraska. University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural resources. 4 pp.
- Jendoubi, W., Bouhadida, M., Boukteb, A., Beji, M and Kharrat, M. 2017. Fusarium Wilt Affecting Chickpea Crop. *Agriculture* 7(23): 1–16. doi:10.3390/agriculture7030023.
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. del M., Landa, B. B and Navas-Cortés, J. A. 2015. Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop protection* 73(1): 16–27.
- Jiménez-Fernández, D., Navas-Cortés, J. A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., and Landa, B. B. 2011. Molecular and pathogenic characterizatio of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. *Plant Disease* 95:860-870.
- Kamal, M. M., Savocchia, S., Lindbeck, K. D and Ash, G. J. 2016. Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. *Australasian Plant Pathology* 45:1–14.
- Kanakala, S and Kuria, P. 2019. *Chickpea chlorotic dwarf virus*: An Emerging Monopartite Dicot Infecting Mastrevirus. *Viruses* 11 (5): 1–15.
- Korbu, L., Fikre, A., Tesfaye, K., Funga, A., Bekele, D and Ojiewo, C. O. 2022. Response of chickpea to varying moisture stress conditions in Ethiopia. *Agrosystems, Geosciences and Environment* 5: e20234. <https://doi.org/10.1002/agg2.20234>.
- Kumar, P. L., Kumari, S. M. G and Waliyar, F. 2008. Virus diseases of chickpea. In Govind, P. R., Kumar, P. L and Holguin-Peña, R. J. *Characterization, Diagnosis and management of plant viruses*. Studium Press, Texas, USA. pp. 213–234.
- Kumari, A and Ghatak, A. 2018. Variability in Chickpea Rot-causing Soil-borne Necrotrophs, *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Journal of AgriSearch* 5(4): 247–253 <https://doi.org/10.21921/jas.5.4.6>
- Kumari, A., Ghatak, A and Srinivasaraghavan, A. 2020. Biochemical responses of soil-borne necrotroph *Sclerotium rolfsii* during the pathogenesis on chickpea. *International Journal of Chemical Studies* 8(1): 2596–2601.

- Lamont, G. E and Bennett, S. J. 2019. Lesion and sclerotia development in four pulse species when inoculated with different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Proceedings of the 2019 Agronomy Australia Conference, 25 – 29 August 2019, Wagga Wagga, Australia.
- Machado, A. R., Pinho, D. B., Soares, D. J., Gomes, A. A. M and Pereira, O. L. 2019. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 153(1):89–100. doi:10.1007/s10658-018-1545-1
- Manjunatha, H and Saifulla, M. 2018. Variation in virulence of *Macrophomina phaseolina* isolates causing dry root rot of chickpea and performance of chickpea genotypes against this disease. *Legume Research*, 41(3): 468–473.
- Marquez, N., Giachero, M. L., Declerck, S and Ducasse, D. A. 2021. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. *Frontiers in Plant Science*. 12:634397. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2021.634397.
- Millan, T., Clarke, H. J., Siddique K. H. M., Buhariwalla, H. K., Gaur, P. M., Kumar, J., Gil, J., Kahl, G and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. *Euphytica* 147(1): 81–103.
- Moparthy, S., Peluola, C., Agindotan, B., McPhee, K., Burrows, M. 2020. First report of gray mold of chickpea caused by *Botrytis euroamericana* in the USA, *Crop Protection*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105297>.
- Mwape, V. W., Mobegi, F. M., Regmi, R., Newman, T. E., Kamphuis, L. G and Derbyshire, M. C. 2021. Analysis of differentially expressed *Sclerotinia sclerotiorum* genes during the interaction with moderately resistant and highly susceptible chickpea lines. *BMC Genomics* 22(333): 1–14
- Nandeesh, K. L., Huilgol, S. N and Goudar, G. D. 2020. Eco Friendly Management of Fusarium Wilt of Chickpea with Botanicals and Bio Agents in *In-vitro*. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry* 21(24): 192–196.
- Nandeesh, K. L and Huilgol, S. N. 2021. Integrated management of fusarium wilt of chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 10(1): 975–977.
- Nene, Y. L., Reddy, M. V., Haware, M. P., Ghanekar, A. M and Amin, K. S. 2012. Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. Information Bulletin No. 28. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Andhra Pradesh, India. pp. 1–56.
- Ortega-Murrieta, P. F., Fierros-Leyva, G. A., Padilla-Valenzuela, I., Valenzuela-Herrera, V., Acosta-Gallegos, J. A., Gutiérrez-Perez, E., Velarde-Félix, S y Rodríguez-Cota, F. G. 2016. Blanoro, nueva variedad de garbanzo blanco de grano extra grande para exportación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(1): 209–216.
- Pachauri, P and Sikarwar, R. S. 2022. Scientific cultivation of chickpea in India. *The Pharma Innovation Journal* 11(2): 1187–1191.
- Paredes-Escalante, J. E., Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J. A y Valdez-Torres, J. B. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1): 27–35.

- Padilla-Valenzuela, I., Valenzuela-Valenzuela, R. I., Armenta-Castro, C. M., Salinas-Pérez, R. A., Sánchez-Sánchez, E. 2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(1):43–49.
- Patidar, J. K., Singh, R., Singh, P. K and Fatehpuria, P. K. 2019. Screening of chickpea lines against dry root rot of chickpea caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(1): 1030–1032.
- Pawar, G. S., Gholve, V. M and Navale, M. D. 2021. *In vitro* efficacy of Fungicides against stem rot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *The Pharma Innovation Journal* 10(12): 2150–2154.
- Pradhan, P., Kumar, N. D and Mahapatra, M. 2021. Biochemical Analysis Based on Zinc Uptake of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Varieties Infected by *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Plant and Soil Science* 33(24): 186–192.
- Punja, Z. K. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* 23:97–127
- Rai, A., Irulappan, V and Senthil-Kumar, M. 2022. Dry root rot of chickpea: A disease favored by drought. *Plant Disease* 106(2): 346–356.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G and Crous, P. W. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40(1): 1–25.
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L and Crous, P. W. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia* 43(1): 90–185.
- Santos, K. M., Lima G. S., Barros A. P. O., Machado A. R., Souza M. C. M., Correia K. C., Michereff, S. J. 2020. Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. *European Journal of Plant Pathology* 156: 1213–1218. doi:10.1007/s10658-020-01952-8
- Shahzaman, A. Md., Minnatullah, Md and Upadhyay, J. P. 2020. Management of chickpea collar rot by integration of biological and chemical seed treatment. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8(4): 42–46.
- Sharma, M., Ghosh, R and Pande, S. 2016: Dry root rot (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler): an emerging disease of chickpea – where do we stand?. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2016.1140564
- Shekhawat, D. S., Tiwari, S and Nathawat, B. D. S. 2021. Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* management through combination of Essential oils and bioagents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 10(1): 901–904.
- Sheshma, M. K., Kumhar, D. R., Kumar, D., Varma, S and Devi, D. 2022a. Screening of chickpea genotypes/varieties against Sclerotinia rot of chickpea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary under natural conditions. *The Pharma Innovation Journal* 11(2): 1692–1695.
- Sheshma, M. K., Kumhar, D. R., Kumar, D., Varma, S and Devi, D. 2022b. Occurrence and dispersal of Sclerotinia rot of chickpea incited by *Sclerotinia sclerotiorum* in Rajasthan. *The*

Pharma Innovation Journal 11(2): 1696–1700.

- Shirsole, S. S., Khare, N., Lakpale, N and Kotasthane, A. S. 2019. Evaluation of fungicides against *Sclerotium rolfsii* Sacc. Incitant of collar rot of chickpea. The Pharma Innovation Journal 8(12): 310–316.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Panorama Agroalimentario 2021. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021 (consultado diciembre 2021).
- Siddiqui, Z. A and Mahmood, I. 1994. Interactions of *Meloidogyne javanica*, *Rotylenchulus reniformis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and *Bradyrhizobium japonicum* on the wilt disease complex of chickpea. Nematologia Mediterranea 22: 135–140.
- Singh, K., Meena, C. B., Gautam, C and Jewaliya, B. 2022. Symptomatology, isolation and pathogenicity test of the collar rot of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Incitant by *Sclerotium rolfsii* (Sacc.). The Pharma Innovation Journal 11(3): 23–29.
- Srividya, P.V., Ahamed, M.L., Ramana, J.V and Ahammed, S.K. 2020. Studies on Diversity of *Sclerotium rolfsii* Causing Collar Rot in Chickpea using Morphological and Molecular Markers. Legume Research 43: 1–8.
- Sunkad, G., Deepa, H., Shruthi, T. H and Sing, D. 2019. Chickpea wilt: status, diagnostics and management. Indian Phytopathology. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00154-5>
- Suresh, B. A., Zacharia, S and Kar, S. R. 2022. Eco-friendly management of chickpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Schlecht & Emend Synd. & Hans.). The Pharma Innovation Journal 11(3): 1284–1288.
- Trapero, C. A y Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Etiología, importancia y distribución de la seca del garbanzo en el valle de Guadalquivir. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 11: 69–145.
- Vishruta, D. B and Nath, K. 2021. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes against collar rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. Journal of Experimental Agriculture International 43(6): 9–18.
- Wang, M., Van Vleet, S., McGee, R., Paulitz, T., Porter, L., Schroeder, K., Vandemark, G and Chen, W. 2021. Chickpea seed rot and damping-off caused by metalaxyl-resistant *Phytophthora ultimum* and its management with ethaboxam. Plant Disease 105(6): 1728–1737.
- Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M and Smith, D. L. 2019. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. Tropical Plant Pathology 44(1): 3–11.
- Yadav, S and Kumar, S. 2019. Screening and evaluation of *Cicer arietinum* genotypes against *Fusarium* wilt under sick field and artificial condition. Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences 21(4): 1068–1075.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C. M., Wingfield, B. D and Crous. P. W. 2021. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. Persoonia 46(1): 129–162
- Yogesh, S. A and Vandana, U. W. 2021. *In vitro* mycoparasitism activity of *Trichoderma* spp., against *Fusarium solani* inciting root rot of chickpea (*cicer arietinum* L.). World Journal of Pharmaceutical Research 10(9): 449–457.

**2. MOLECULAR DETECTION, VIRULENCE, AND MYCELIAL COMPATIBILITY OF
Macrophomina phaseolina ISOLATES ASSOCIATED WITH CHICKPEA WILT IN
SINALOA AND SONORA, MEXICO**

**CARLOS I. COTA-BARRERAS¹, RAYMUNDO S. GARCÍA-ESTRADA¹, JOSÉ B.
VALDEZ-TORRES¹, JOSEFINA LEÓN-FÉLIX¹, VÍCTOR VALENZUELA-HERRERA²,
AND JUAN M. TOVAR-PEDRAZA¹**

¹*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán,
Culiacán, 80110, Sinaloa, Mexico*

²*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental
Valle de Culiacán, Culiacán, 80130, Sinaloa, Mexico*

Correspondence to: Juan Manuel Tovar Pedraza. **E-mail:** juan.tovar@ciad.mx

Published: 08 Jun 2022

DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2084642>

Canadian Journal of Plant Pathology

Molecular detection, virulence, and mycelial compatibility of *Macrophomina phaseolina* isolates associated with chickpea wilt in Sinaloa and Sonora, Mexico

CARLOS I. COTA-BARRERAS¹, RAYMUNDO S. GARCÍA-ESTRADA ¹, JOSÉ B. VALDEZ-TORRES ¹, JOSEFINA LEÓN-FÉLIX ¹, VÍCTOR VALENZUELA-HERRERA² AND JUAN M. TOVAR-PEDRAZA ¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Culiacán, 80110, Mexico

²Campo Experimental Valle de Culiacán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Culiacán, 80130, Mexico

(Accepted 26 May 2022)

Abstract: Three *Macrophomina* species (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. eufhorbiticola*) associated with various crops worldwide have been distinguished to date by DNA sequence analysis; however, no studies have been conducted to identify *Macrophomina* species occurring on chickpea in Mexico. The aims of this study were to identify *Macrophomina* isolates associated with chickpea wilt through the use of species-specific primers, as well as to determine their virulence and mycelial compatibility. During the 2019 growing season, 58 *Macrophomina* isolates were obtained from symptomatic plants collected from 19 chickpea crops distributed in the states of Sinaloa and Sonora, Mexico. The identity of all 58 isolates was determined by PCR using three sets of primers specific to three *Macrophomina* species (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. eufhorbiticola*). Virulence was determined by inoculating chickpea seedling roots with a mycelial suspension and disease severity was assessed 30 days after inoculation. Molecular detection with species-specific primers indicated that all isolates belong to *M. phaseolina*, with significant differences found in their virulence. Mycelial compatibility testing showed that there are at least six mycelial compatibility groups of *M. phaseolina* distributed in chickpea fields in Sinaloa and Sonora. This information will serve as a basis for future studies on the epidemiology and management of the disease caused by *M. phaseolina* on chickpea in Mexico.

Keywords: *Cicer arietinum*, *Macrophomina phaseolina*, mycelial compatibility, pathogenicity, species-specific primers

Résumé: Trois espèces de *Macrophomina* (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* et *M. eufhorbiticola*), associées à diverses cultures dans le monde, ont été différenciées à ce jour par l'analyse des séquences de l'ADN. Toutefois, aucune étude n'a été menée pour identifier l'espèce de *Macrophomina* qui vit sur les pois chiches au Mexique. Les buts de cette étude étaient d'identifier les isolats de *Macrophomina* associés à la flétrissure du pois chiche grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques des espèces, de même que de déterminer leur virulence et leur compatibilité mycélienne. Durant la saison de croissance de 2019, 58 isolats de *Macrophomina* ont été obtenus de plants symptomatiques collectés dans 19 cultures de pois chiches des États du Sinaloa et du Sonora, au Mexique. L'identité des 58 isolats a été déterminée par PCR en utilisant trois jeux d'amorces spécifiques de trois espèces de *Macrophomina* (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* et *M. eufhorbiticola*). La virulence a été établie en inoculant des racines de plantules de pois chiches avec une suspension de mycélium, puis la gravité de la maladie a été évaluée 30 jours après l'inoculation. La détection moléculaire avec les amorces spécifiques des espèces a indiqué que tous les isolats appartenaient à *M. phaseolina*, mais que leur degré de virulence variait significativement. Les essais sur la compatibilité mycélienne ont démontré qu'il y a au moins six groupes de compatibilité mycélienne de *M. phaseolina* répartis dans les champs de pois chiches du Sinaloa et du Sonora. Cette information servira de référence aux prochaines études sur l'épidémiologie et la gestion de la maladie causée par *M. phaseolina* chez les pois chiches au Mexique.

Mots clés: *Cicer arietinum*, *Macrophomina phaseolina*, pathogénicité, compatibilité mycélienne, amorces spécifiques des espèces

Correspondence to: Juan M. Tovar-Pedraza juan.tovar@ciad.mx

© 2022 The Canadian Phytopathological Society

Published online 08 Jun 2022

Introduction

Chickpea (*Cicer arietinum* L.), the only cultivated species of the genus *Cicer*, is native to eastern Turkey. It is also the third most important legume worldwide, with 96% of production in developing countries. Mexico ranks 8th in the world with a production of 202846 tons; the main producing states include Sinaloa, Sonora, Michoacán, Guanajuato, and Baja California Sur, with the first two contributing the highest percentage (79%) of production (SIAP 2020). Chickpea is valued for the high protein content in its seed and is used increasingly as a substitute for animal protein (Shinde and Hunje 2019). There are two different types of chickpeas: desi and kabuli (white); the latter is considered economically more important and receives a higher price in the market compared with the desi type (Jendoubi et al. 2017).

Among the main limiting factors in chickpea production are root rot and wilt caused by a complex of soilborne fungi such as *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Sclerotium rolfsii* Sacc., and *Rhizoctonia solani* Kühn (Fierros-Leyva et al. 2019). This complex of fungi can cause yield losses of up to 80% in Mexico (Padilla-Valenzuela et al. 2008).

Macrophomina phaseolina is a seed- and soilborne fungus with great morphological, physiological, pathogenic, and genetic variability, which increases its adaptability to various environmental conditions (Beas-Fernández et al. 2006; Reyes-Franco et al. 2006; Marquez et al. 2021). This fungus belongs to the family Botryosphaeriaceae and attacks more than 500 plant species (Kaur et al. 2012; Sarr et al. 2014), including economically important hosts such as soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Mönch.), peanut (*Arachis hypogaea* L.), chilli (*Capsicum annuum* L.), chickpea, cotton (*Gossypium hirsutum* L.), and canola (*Brassica napus* L.) (Leyva-Mir et al. 2015). Disease symptoms caused by *M. phaseolina* include poor growth, yellowing, and wilting (Dhingra and Sinclair 1978; Manjunatha and Saifulla 2018); these occur because the pathogen affects the roots and invades the xylem vessels, thereby blocking the water flow in the plant (Muñoz-Cabañas et al. 2005). In addition, phytotoxic metabolites produced by *M. phaseolina* have been described, including phaseolinon, botryodiplodin, and patulin, which are believed to play a role in the initial stages of infection, causing wilting of seedlings and formation of necrotic lesions on leaves and roots (Abbas et al. 2020; Salvatore et al. 2020; Marquez et al. 2021).

Several studies have associated *M. phaseolina* as the only *Macrophomina* species causing root rot and wilt symptoms in chickpea (Diaz-Franco and Montes-García 2008; Ávila-Miramontes et al. 2015; Khan et al. 2017; Lakhran et al. 2018; Živanov et al. 2019). In India, this pathogen can cause yield losses of 10% to 25% in the crop (Manjunatha et al. 2013). However, three cryptic species of *Macrophomina* (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye, and *M. euphorbiticola* Machado, Soares & Pereira) have been recently recognized worldwide. These species can only be distinguished by using species-specific primers (Santos et al. 2020) or by multi-locus phylogenetic analysis with combined sequence data from the internal transcribed spacer (ITS) region, as well as fragments of genes such as actin (*ACT*), β -tubulin (*β T*), calmodulin (*CAL*), and translation elongation factor 1- α (*TEF-1 α*) (Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019).

Mycelial compatibility has been used to assess genetic diversity among *M. phaseolina* isolates in various countries (Barzegar and Banihashemi 2019; Csöndes 2011; Csüllög and Tarcali 2020). In Mexico, there are no studies on the mycelial compatibility of *Macrophomina* isolates, and the identity of the different species has not been verified with species-specific primers for each of the three species described worldwide. The objectives of this research were to identify *Macrophomina* isolates associated with root rot and wilt symptoms on chickpea plants in fields in Sinaloa and Sonora, Mexico, by using species-specific primers of the *TEF1- α* gene, in addition to estimating virulence and determining the mycelial compatibility of fungal isolates.

Materials and methods

Sample collection

During the 2019 growing season, chickpea plants (cv. Blanco Sinaloa '92) with chlorosis, root rot, and wilt symptoms (Fig. 1) were collected from 18 commercial fields distributed in the municipalities of Guasave, Mocolito, Salvador Alvarado, Angostura, and Culiacán in the state of Sinaloa, Mexico. In addition, diseased plants were collected from a site located in the municipality of Hermosillo, Sonora, Mexico. Samples were collected from each field at three phenological stages (leaf growth, flowering, and pod fill).

Isolation, purification, and preservation of fungi

Macrophomina isolates were obtained using the procedures described by Crous et al. (2009). For isolation, 5-mm long pieces of diseased root tissue were cut, surface disinfested by



Fig. 1 Chickpea wilt caused by *Macrophomina phaseolina*. (a–b) Chickpea fields with high disease incidence. (c) Chickpea plants showing chlorosis and wilt. (d) Early symptoms of stem and root rot. (e) Advanced symptoms of stem and root rot.

immersion in 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 2 min, rinsed twice in sterile distilled water for 1 min, and dried with sterile absorbent paper. Subsequently, the disinfested pieces were placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) culture medium (Difco®, USA). The Petri dishes were incubated at 25°C in the dark for 72 h and then mycelial plugs (5 mm in diameter) from the edge of actively growing *Macrophomina*-like colonies were transferred to Petri dishes with fresh PDA and incubated at 25°C for

seven days. To verify the identity of the isolates, morphology of mycelia and microsclerotia of all isolates was examined using light microscopy. Pure cultures were obtained using the hyphal-tip technique on water agar (WA) culture medium and transferred to plates with PDA medium. The *Macrophomina* isolates used in this study were deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Culiacán, Sinaloa, Mexico) under the accession nos.

CCLF20 to CCLF77. Mycelial plugs of the fungal isolates were maintained in sterile distilled water at 4°C and in 10% glycerol at -80°C.

DNA extraction and PCR amplification

Genomic DNA was extracted according to the CTAB method (Doyle and Doyle 1990). Aerial mycelium from 7-day-old *Macrophomina* colonies cultured on PDA medium was scraped with a sterile spatula, macerated in a sterile mortar using liquid nitrogen, and transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 500 µL of buffer solution (100 mM Tris, pH 8; 20 mM of EDTA, pH 8; 1.4 M NaCl; 3% CTAB; 0.2 mg mL⁻¹ of proteinase K), vortexed for 10s and incubated for 60 min at 65°C. Then, 700 µL of chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v) was added, vortexed for 10s and placed in a 5810 R centrifuge (Eppendorf®, USA) at 13000g for 10 min. The supernatant was transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube and 700 µL of isopropanol was added. The tubes were mixed by inversion four to five times and stored at -20°C for 10 min, then centrifuged at 13 000 g for 10 min and the supernatant was discarded. Subsequently, 500 µL of 70% ethanol was added to each tube, centrifuged at 13 000 g for 5 min, and the supernatant was again discarded. The tubes were placed on blotting paper until the ethanol evaporated, and when the pellet was dry, 100 µL of DNase/RNase-free distilled water was added. DNA quality and concentration were quantified with a Q-3000 UV spectrophotometer (Quawell®, USA). The DNA was stored at -20°C for later use.

For the PCR analysis, we used species-specific primers targeting the translation elongation factor 1- α (*TEF1- α*) gene of *M. phaseolina* (MpTefF-AAACACACTTTTCGCA CTCCTGC, MpTefR-TATGCTCGCAGAGAAGAACA CGA), *M. pseudophaseolina* (MsTefF-GCACACTTTT CGCGCTTCTGTA, MsTefR-TGTGCTCGCTGGGAAG AACATGA), and *M. euphorbiicola* (MeTefF-AAGCAT ACTTTTCGTGCTCCTGC, MeTefR-AAAGGAACAT GAGTGGCCAAAAA), which were designed and reported by Santos et al. (2020). The reaction mixture was prepared with a final volume of 25 µL, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM of each primer, 0.04 U DNA polymerase (Promega®, USA) and 4 ng of DNA. PCR was carried out in a C-1000 thermal cycler (Bio-Rad®, USA) under the following conditions: an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing for 30s at 67, 69, or 65°C for the primers MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, and MeTefF/MeTefR, respectively; extension at 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 10 min. The amplified products were verified by 1% agarose gel

electrophoresis with 1X TAE buffer and stained with ethidium bromide. To run electrophoresis at 90 volts, 7 µL of the PCR product and 3 µL of loading buffer were used. The gel was analysed on a Gel Doc XR + Gel Documentation System transilluminator (Bio-Rad®, USA). Positive controls of DNA for *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola* were kindly provided by Dr. Sami Jorge Michereff (Universidade Federal do Cariri, Brazil).

Pathogenicity and virulence test

The pathogenicity of *Macrophomina* isolates was verified by inoculating chickpea seedlings of a susceptible genotype (Blanco Sinaloa '92) under greenhouse conditions according to the procedures described by Robles-Yerena et al. (2016) and Jarek et al. (2018), with some modifications. For inoculum preparation, each *Macrophomina* isolate was cultured in PDA medium at 25°C for 10 days. The mycelial growth was scraped with a slide, placed in sterile distilled water, and liquefied for 10s using a waring blender. The inoculum suspension was adjusted to a concentration of 1 × 10⁵ mycelial fragments mL⁻¹ and Tween 20® was added. Chickpea seeds were sown in 128-cavity polystyrene trays (60 mL per cavity) containing an autoclaved mixture of peat moss and sand (2:1). Seedlings were regularly watered to keep the growth substrate in a wet condition. Fifteen-day-old chickpea seedlings were carefully removed from their cavities.

The roots were washed with sterile distilled water and inoculated by immersion in the mycelial suspension for 30 min. Once the time had elapsed, the seedlings were placed again in trays with sterile substrate and kept in a greenhouse at a temperature of 25 to 35°C. Each isolate was inoculated on seven plants and the experiment was repeated twice. The roots of 10 control seedlings were immersed in sterile distilled water.

The observation of symptom progress was performed daily and the evaluation of disease severity was carried out 30 days after inoculation using a 5-category visual scale, where 0 = no visible symptoms, 1 = less than 25% foliage diseased, 2 = 25 to 50% foliage diseased, 3 = 50 to 75% foliage diseased, 4 = more than 75% foliage diseased. The scale values were transformed to percent values and virulence assay data were analysed. Normality and homogeneity of variances were first checked through Shapiro-Wilk test and Levene test, respectively. Variances of the two experiments were not statistically different for each test; therefore, the raw data for the two repeats of each

experiment were combined for subsequent analysis. Then, data were subjected to analyses of variance (ANOVA) and means were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test, at 5% probability using PROC GLM in SAS (version 9.3; SAS Institute, Cary, NC). Isolates were treated as fixed effects. Uninoculated controls were excluded from statistical analysis.

Mycelial compatibility

Mycelial compatibility tests for the 58 *Macrophomina* isolates were carried out in Petri dishes (90 mm in diameter) containing PDA medium. A mycelial plug (6 mm in diameter) from five different isolates was individually placed on the periphery of a Petri dish and one different isolate was placed in the centre. The 58 *Macrophomina* isolates were tested in combinations with three replicates for each combination. Each isolate was paired with 57 other isolates and itself at least three times. Petri dishes were incubated at 25°C in constant darkness and the union of colonies was evaluated at 7, 10, and 14 days. The relationship was defined visually based on Csöndes (2011); it was considered compatible when the mycelia grew into each other and one continuous colony was created, whereas, the relationship was considered incompatible when a clearly defined barrier (blocking zone) was formed between the colonies and some of the hyphae were destroyed. Mycelial compatibility groups (MCGs) were identified based on data from compatible reactions among tested isolates. The entire experiment was performed twice. Isolates that had conflicting results between replications were paired with each other a fourth time.

Results

Fungal isolates

A total of 58 *Macrophomina* isolates were obtained from chickpea plants with chlorosis and wilt symptoms across 19 fields distributed in the municipalities of Salvador Alvarado (17 isolates), Mocorito (11 isolates), Guasave (6 isolates), Angostura (3 isolates), Culiacán (1 isolate) in Sinaloa, as well as in Hermosillo (20 isolates) in Sonora.

Identification with species-specific primers

Identification of *Macrophomina* isolates associated with chickpea wilt in Sinaloa and Sonora, Mexico with species-specific *TEF1-α* gene primers indicated that all 58 isolates were *M. phaseolina*. This was because only the expected 217-bp PCR amplicon of the species-specific primers for *M. phaseolina* (MpTefF/MpTefR) was obtained (Santos et al. 2020), but there was no amplification when using the species-specific primers for *M. pseudophaseolina* (MsTefF/MsTefR) and *M. euphorbiticola* (MeTefF/MeTefR).

Pathogenicity and virulence

All inoculated chickpea plants showed chlorosis symptoms, wilting, and premature defoliation 30 days after inoculation (Fig. 2a), while control plants remained disease-free (Fig. 2b), confirming the pathogenicity of the 58 *Macrophomina phaseolina* isolates. Statistical analysis showed significant differences ($P \leq 0.05$) between the virulence of fungal isolates (Fig. 3). The most virulent isolates



Fig. 2 Chickpea plants cv. Blanco Sinaloa 92 artificially inoculated with *Macrophomina phaseolina*. (a) Symptoms on chickpea plants, 30 days after inoculation. (b) Control plants.

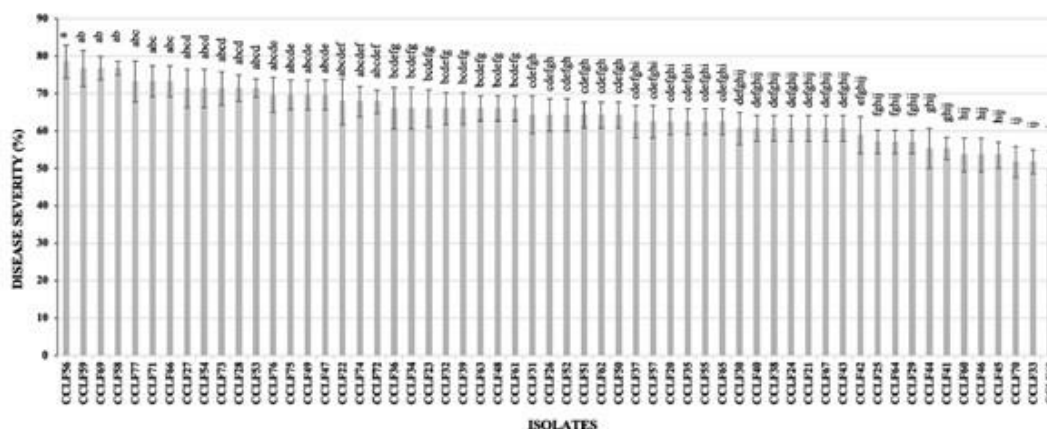


Fig. 3 Disease severity caused by 58 *Macrophomina phaseolina* isolates associated with chickpea wilt in the Northwest region of Mexico (States of Sinaloa and Sonora), 30 days after inoculation onto roots of chickpea cv. Blanco Sinaloa. Error bars represent standard error. Columns with the same letter do not differ significantly, according to Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$).

(>70% severity) were recorded in chickpea fields in the municipalities of Salvador Alvarado, Mocorito, and Guasave, while the less virulent isolates (<60% severity) occurred at Salvador Alvarado, Mocorito, Guasave, and Angostura in the state of Sinaloa. Of the 20 isolates obtained from a chickpea field in the municipality of Hermosillo, in the state of Sonora, three showed a mean severity of greater than 70%, 14 isolates had a mean of 60 to 70%, and three isolates had a mean <60% (Fig. 3).

Mycelial compatibility

The compatibility tests among the 58 *M. phaseolina* isolates showed a total of six MCGs, which are shown in Table 1. Forty-two isolates (72.4%) were assigned to MCG-I, five isolates (8.62%) to MCG-II, four isolates (6.89%) to MCG-III, three isolates (5.17%) to MCG-IV, two isolates (3.44%) to MCG-V, and two isolates (3.44%) to MCG-VI.

MCG-I had a wide geographical distribution and occurred in all municipalities except at Culiacán, Sinaloa. In contrast, the remaining five MCGs had a limited geographical distribution. MCG-II was found at Mocorito and Angostura municipalities from Sinaloa state, as well as at Hermosillo from Sonora state. MCG-III was recorded at Culiacán, Salvador Alvarado, and Hermosillo (Sonora). MCG-IV occurred only at Guasave, Sinaloa and Hermosillo, Sonora. MCG-V was found only at Mocorito and Salvador Alvarado in Sinaloa. MCG-VI was recorded at Salvador Alvarado, Sinaloa and Hermosillo, Sonora.

Regarding sampled states, all MCGs were identified in Sinaloa, whereas MCG-V was not present in Sonora; however, it was not possible to relate the mycelial compatibility

grouping and geographic distribution of the isolates because of the small number of isolates analysed.

Discussion

This study determined, by using species-specific primers amplifying the *TEF1- α* gene, that *M. phaseolina* is the predominant *Macrophomina* species in chickpea fields in the states of Sinaloa and Sonora, Mexico. Previous studies identified three *Macrophomina* species (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*) by multilocus phylogenetic analyses using combined ITS, *ACT*, *β T*, *CAL*, and *TEF1- α* sequence data (Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019) as well as phylogenetic analyses using only sequences from the ITS region (Wagan et al. 2019; Pandey et al. 2020). However, Machado et al. (2019) and Santos et al. (2020) indicated that ITS sequences are not sufficient to distinguish between the three *Macrophomina* species. Species-specific primers that amplify a fragment of the *TEF1- α* gene are just as effective, but much cheaper, faster, and easier to use compared to multilocus phylogenetic analyses, which are laborious and expensive; they also require time and knowledge of phylogenetic identification for species distinction (Santos et al. 2020). Similarly, Negreiros et al. (2019) reported that the use of species-specific primers showed potential to be used as a tool to identify known species of *Macrophomina* and other Botryosphaeriaceae species.

All *M. phaseolina* isolates evaluated in this study were pathogenic to inoculated chickpea plants and the symptoms observed were root rot, chlorosis, and premature defoliation. Regarding virulence, *M. phaseolina* isolates showed

Table 1. Origin, mycelial compatibility groups (MCGs) of *Macrophomina phaseolina* isolates collected from chickpea plants in Sinaloa and Sonora, Mexico.

Isolate code	Site	Origin	Collection date	MCG
CCLF70	1	Mocorito, Sinaloa	January 2019	I
CCLF72	1	Mocorito, Sinaloa	January 2019	I
CCLF74	2	Mocorito, Sinaloa	February 2019	I
CCLF37	3	Mocorito, Sinaloa	February 2019	I
CCLF77	3	Mocorito, Sinaloa	February 2019	I
CCLF20	4	Mocorito, Sinaloa	January 2019	I
CCLF22	4	Mocorito, Sinaloa	January 2019	I
CCLF35	4	Mocorito, Sinaloa	January 2019	I
CCLF25	4	Mocorito, Sinaloa	January 2019	II
CCLF36	4	Mocorito, Sinaloa	January 2019	II
CCLF71	5	Mocorito, Sinaloa	January 2019	V
CCLF32	6	Culiacán, Sinaloa	January 2019	III
CCLF40	7	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF23	8	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF26	8	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF68	8	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF53	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF56	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	I
CCLF41	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	III
CCLF75	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	January 2019	V
CCLF27	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF28	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF59	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF49	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	III
CCLF38	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	VI
CCLF24	11	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF21	11	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF39	11	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF45	12	Salvador Alvarado, Sinaloa	February 2019	I
CCLF63	13	Guasave, Sinaloa	February 2019	I
CCLF48	14	Guasave, Sinaloa	January 2019	I
CCLF60	14	Guasave, Sinaloa	January 2019	I
CCLF54	14	Guasave, Sinaloa	January 2019	I
CCLF55	14	Guasave, Sinaloa	January 2019	I
CCLF66	15	Guasave, Sinaloa	February 2019	IV
CCLF33	16	Angostura, Sinaloa	January 2019	I
CCLF46	17	Angostura, Sinaloa	January 2019	I
CCLF47	18	Angostura, Sinaloa	January 2019	II
CCLF31	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF34	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF42	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF44	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF51	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF52	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF57	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF58	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF61	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF62	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF64	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF69	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF73	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF76	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	I
CCLF30	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	II
CCLF67	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	II
CCLF65	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	III
CCLF29	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	IV
CCLF43	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	IV
CCLF50	19	Hermosillo, Sonora	June 2019	VI

significant differences and were grouped into three categories. These differences may be due to the fact that *M. phaseolina* is highly variable because of the large number of polykaryotic characteristics of the mycelium, mutation, hyphal fusion, and mitotic recombination; this pathogenic variability has been described in different hosts, including soybean and sunflower (*Helianthus annuus* L.) (Dhingra and Sinclair 1978; Jiménez et al. 1983). There are several studies similar to ours in which the pathogenicity *M. phaseolina* has been reported in other plant hosts with differences in virulence, which may vary depending on the region of origin of the isolates (Echávez and Perdomo 1991; Mayek-Pérez et al. 2001; Muñoz-Cabañas et al. 2005; Aghakhani et al. 2009; Manjunatha and Saifulla 2018; Negreiros et al. 2019; Garcia et al. 2019).

In the present study, six MCGs were identified, indicating a high level of genetic variability among Mexican *Macrophomina phaseolina* isolates. Mayek-Pérez et al. (2001) and Muñoz-Cabañas et al. (2005) obtained high percentages of polymorphism by means of AFLP analysis in *M. phaseolina* isolates from Mexico, which revealed the existence of great genetic diversity, showing the polykaryotic nature or the possibility of genetic recombination in this plant pathogenic fungus. Similarly, Barzegar and Banihashemi (2019) reported a total of 33 different MCGs of *M. phaseolina* in Iran, showing the existence of high genetic diversity among the fungal isolates. In contrast, Csöndes (2011) registered high compatibility among 53 *M. phaseolina* isolates obtained from sunflower, maize, and soybean in Serbia, Hungary, and Spain. This result is significant since mycelial compatibility is a precondition for DNA exchange through anastomosis between two compatible isolates, which increases the possibility of parasexual recombination and therefore the maintenance of genetic diversity in *M. phaseolina* (Almeida et al. 2003; Kmjaja et al. 2013).

Our results showed that five of six MCGs occurred in Sonora, and MCG-V was only present in Sinaloa, indicating that the MCGs could be distributed at different geographical sites in the states of Sinaloa and Sonora; however, further studies examining a large number of isolates from several MCGs are required in order to resolve this uncertainty. The variability of a pathogen in a geographic area can be estimated through this type of study, in addition to other factors that can provide information on this variation, such as rapid growth, mycelial dispersion, and the abundant production of microsclerotia (Purkayastha et al. 2006). Other authors such as Mihail and Taylor (1995), Vandemark et al. (2000), Csöndes (2011) Csüllög and Tarcali (2020), stated that identical or similar fungal genotypes can spread over long distances via transport of

infected seed and material with resistance structures (microsclerotia) of the fungus, which play a very important role in the dissemination and propagation.

In conclusion, molecular detection by amplification of a fragment of the *TEF1-α* gene using species-specific primers revealed that all 58 *Macrophomina* isolates from chickpea were *M. phaseolina*. Inoculation of the fungus onto chickpea roots indicated that all isolates were pathogenic and there is a difference in their virulence. In addition, the mycelial compatibility test showed that some isolates had the ability to fuse hyphae, giving a total of six MCGs among the 58 isolates of *M. phaseolina* obtained from chickpea fields in the states of Sinaloa and Sonora, Mexico. These findings have important implications and further studies on the impact, epidemiology, fungicide sensitivity, and disease resistance are needed for the development of suitable management strategies for the disease in Mexican chickpea fields.

Acknowledgements

We thank Rosalía López-Corrales, Edén Salenko Guerrero-Soto, and Alsino Villarreal-Wong for providing assistance during the pathogenicity tests. We also thank the anonymous reviewers for their critical comments and suggestions for improving the manuscript.

Disclosure statement


No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

Raymundo S. García-Estrada  <http://orcid.org/0000-0001-6129-8128>

José B. Valdez-Torres  <http://orcid.org/0000-0002-9155-6981>

Josefina León-Félix  <http://orcid.org/0000-0003-3755-881X>

Juan M. Tovar-Pedraza  <http://orcid.org/0000-0002-8560-959X>

References

Abbas HK, Bellaloui N, Butler AM, Nelson JL, Abou-Karam M, Shier WT. 2020. Phytotoxic responses of soybean (*Glycine max* L.) to

- botryodiplodin, a toxin produced by the Charcoal Rot Disease Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Toxins*. 12:25. doi:10.3390/toxins12010025.
- Aghakhani M, Dubey SC. 2009. Determination of genetic diversity among Indian isolates of *Rhizoctonia bataticola* causing dry root rot of chickpea. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96:607–619. doi:10.1007/s10482-009-9375-y.
- Almeida AMR, Abdelnoor RV, Arrabal-Arias CA, Calvalho VP, Jacoud-Filho SS, Marin SRR, Benato LC, Pinto MC, Carvalho CGP. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatol Bras*. 28:279–285. doi:10.1590/S0100-41582003000300009.
- Ávila-Miramontes JA, Padilla-Zaldo G, Martínez-Heredia D, Rivas-Santoyo FJ, Coronado-Espericueta, Ortega-Murrieta P. 2015. Respuesta de algunos componentes del rendimiento del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación de *Mesorhizobium ciceri*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la región agrícola de la Costa de Hermosillo. *Rev Cienc Biol Salud*. 17(3):3–8. doi:10.18633/bt.v17i3.212.
- Barzegar FM, Banihashemi Z. 2019. Mycelial compatibility groups of *Macrophomina phaseolina* in Iran. *Iran J Plant Pathol*. 55(2):115–128. doi:10.22034/ijpp.2019.37319.
- Beas-Fernández R, De Santiago-De Santiago A, Hernández-Delgado S, Mayék-Pérez N. 2006. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *J Plant Pathol*. 88(1):53–60. [accessed 2021 Nov 30]. <https://www.jstor.org/stable/41998280>
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, Samson RA. 2009. Fungal biodiversity. CBS laboratory manual series. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, p. 269.
- Csóndes I. 2011. Mycelial compatibility of Hungarian *Macrophomina phaseolina* isolates. *Acta Agronomica Hungarica*. 59(4):371–377. doi:10.1556/AAgr.59.2011.4.8.
- Csüllög K, Tarcali G. 2020. Investigation of the mycelial compatibility of *Macrophomina phaseolina*. *Folia Oecologica*. 47(2):153–158. doi:10.2478/foecol-2020-0018.
- Dhingra OD, Sinclair JB. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa (Brazil): Universidade Federal de Viçosa, p. 116.
- Díaz-Franco A, Montes-García N. 2008. La fitopatología en la región semiárida de Tamaulipas, México: reseña histórica. *Rev Mex Fitopatol*. 26(1):62–70.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13–15.
- Echávez BR, Perdomo F. 1991. Characterization and comparative pathogenicity of two *Macrophomina phaseolina* isolates from Puerto Rico. *J Agric Univ P R*. 75(4):419–421.
- Fierros-Leyva GA, Acosta-Gallegos JA, Ortega-Murrieta PF, Padilla-Valenzuela I, Álvarez-Bravo A, Ramírez-Soto M, Velarde-Félix S. 2019. Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. *Rev Mex Cienc Agric*. 10(1):131–142. doi:10.29312/remexca.v10i1.1730.
- García MFM, Souza ES, Silva JDD, Melo MP, Mota JM, Almeida NAD, Gomes RLF, Beserra JJE. 2019. Reaction of Lima bean genotypes to *Macrophomina phaseolina*. *Summa Phytopathol*. 45(1):11–17. doi:10.1590/0100-5405/185340.
- Jarek TM, Dos Santos AF, Tessmann DJ, Vieira ESN. 2018. Inoculation methods and aggressiveness of five *Fusarium* species against peach palm. *Cienc Rural*. 48(4):e20170462. doi:10.1590/0103-8478cr20170462.
- Jendoubi W, Bouhadida M, Boukteb A, Beji M, Kharrat M. 2017. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. *Agriculture*. 23(7):1–16. doi:10.3390/agriculture7030023.

- Jiménez-Díaz RM, Blanco-Lopez MA, Sackston WE. 1983. Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. *Plant Dis.* 67:1033–1036. doi:10.1094/PD-67-1033.
- Kaur S, Singh DG, Kaur BS, Edward VG, Chand R, Bahadur CV. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Crit Rev Microbiol.* 38(2):136–151. doi:10.3109/1040841X.2011.640977.
- Khan AN, Shair F, Malik K, Hayat Z, Khan MA, Hafeez FY, Hassan MN. 2017. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. *Front Microbiol.* 8:1309. doi:10.2298/pf1303157k.
- Krnjaja V, Lević J, Stanković S, Vasić T. 2013. The use of vegetative compatibility test for identification of biodiversity of phytopathogenic fungi. *Pestic Phytomed.* 28(3):157–165. doi:10.2298/PIF1303157K.
- Lakhran L, Ahir RR, Choudhary M, Choudhary S. 2018. Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid caused dry root rot of chickpea. *J Pharmacogn Phytochem.* 7:3314–3317.
- Leyva-Mir SG, Velázquez-Martínez GC, Tlapal-Bolaños B, Tovar-Pedraza JM, Rosas-Saito GH, Alvarado-Gómez OG. 2015. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. *Rev Argent Microbiol.* 47(2):143–147. doi:10.1016/j.ram.2015.03.003.
- Machado AR, Pinho DB, Soares DJ, Gomes AAM, Pereira OL. 2019. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oil-seed crops in Brazil. *Eur J Plant Pathol.* 153(1):89–100. doi:10.1007/s10658-018-1545-1.
- Manjunatha SV, Naik MK, Khan MFR, Goswami RS. 2013. Evaluation of bio-control agents for management of dry root rot of chickpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Crop Prot.* 45:147–150. doi:10.1016/j.cropro.2012.09.003.
- Manjunatha H, Saifulla M. 2018. Variation in virulence of *Macrophomina phaseolina* isolates causing dry root rot of chickpea and performance of chickpea genotypes against this disease. *Legume Res.* 41(3):468–473. doi:10.18805/LR-3745.
- Marquez N, Giachero ML, Declerck S, Ducasse DA. 2021. *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. *Front Plant Sci.* 12:634397. doi:10.3389/fpls.2021.634397.
- Mihail JD, Taylor SJ. 1995. Interpreting of variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Can J Bot.* 73:1596–1603. doi:10.1139/b95-172.
- Muñoz-Cabañas RM, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N. 2005. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. *Rev Mex Fitopatol.* 23(1):11–18.
- Myék-Pérez N, López-Castañeda C, González-Chavira M, García-Espinosa R, Acosta-Gallegos JA, Martínez-de la Vega O, Simpson J. 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* on bases of pathogenesis and AFLP genotype. *Physiol Mol Plant Path.* 59:257–264. doi:10.1006/pmpp.2001.0361.
- Negreiros AMP, Sales JR, León M, Melo NJA, Michereff SJ, Ambrosio MMQ, Medeiros HLS, Armengol J. 2019. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. *J Phytopathol.* 167(6):326–337. doi:10.1111/jph.12801.
- Padilla-Valenzuela I, Valenzuela-Valenzuela RI, Armenta-Castro CM, Salinas-Pérez RA, Sánchez-Sánchez E. 2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Rev Fitotec Mex.* 31(1):43–49.
- Pandy AK, Burlakoti RR, Rathore A, Nair R. 2020. Morphological and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolated from three legume crops and evaluation of mungbean genotypes for resistance to dry root rot. *Crop Prot.* 127:1–8. doi:10.1016/j.cropro.2019.104962.
- Purkayastha S, Kaur B, Dilbaghi N, Chaudhury A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathol.* 55:106–116. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01317.x.
- Reyes-Franco MC, Hernández-Delgado S, Beas-Fernández R, Medina-Fernández M, Simpson J, Mayek-Pérez N. 2006. Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *J Phytopathol.* 154:447–453. doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01127.x.
- Robles-Yerena L, Leyva Mir SG, Cruz-Gómez A, Camacho-Tapia M, Nieto-Ángel D, Tovar Pedraza JM. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl. and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. cause wilting of *Pinus* spp. seedlings in the nursery. *Rev Mex Cien For.* 36(7):25–36.
- Salvatore MM, Félix C, Lima F, Ferreira V, Naviglio D, Salvatore F, Duarte AS, Alves A, Andolfi A, Esteves AC. 2020. Secondary metabolites produced by *Macrophomina phaseolina* isolated from *Eucalyptus globulus*. *Agriculture.* 10:72. doi:10.3390/agriculture10030072.
- Santos KM, Lima GS, Barros APO, Machado AR, Souza MCM, Correia KC, Michereff SJ. 2020. Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. *Eur J Plant Pathol.* 156:1213–1218. doi:10.1007/s10658-020-01952-8.
- Sarr M, Ndiaye M, Groenewald J, Crous P. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathol Mediterr.* 53(2):250–268. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-13736.
- Shinde P, Hunje R. 2019. Effect of seed priming on field emergence, plant growth, seed yield and disease incidence in Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *Int J Chem Stud.* 7(1):1512–1517.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Panorama Agroalimentario 2020. [accessed 2021 Oct 15]. <https://www.gob.mx/siap>
- Vandemark G, Martínez O, Pecina V, Alvarado MJ. 2000. Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis. *Mycologia.* 92(4):656–664. doi:10.1080/00275514.2000.12061206.
- Wagan KH, Khaskheli MI, Hajano JD, Lanjar AG. 2019. Population density and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates from Sindh, Pakistan. *Sarhad J Agric.* 35(2):400–407. doi:10.17582/journal.sja/2019/35.2.400.407.
- Živanov D, Živanov TS, Nagl N, Savić A, Katanski S, Milić D. 2019. First report of *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Serbia. *Plant Dis.* 103(10):2685. doi:10.1094/PDIS-03-19-0652-PDN.

3. FIRST REPORT OF *Clonostachys chloroleuca* CAUSING CHICKPEA WILT IN MEXICO

C.I. Cota-Barreras¹, R.S. García-Estrada¹, J. León-Félix¹, V. Valenzuela-Herrera², G.A. Mora-Romero³, K.Y. Madrigal-Leyva³, J.M. Tovar-Pedraza^{1*}

(¹) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, Culiacán, Sinaloa, México.

(²) Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de Culiacán, Culiacán, Sinaloa, México.

(³) Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Los Mochis, Sinaloa, México.

Autor de correspondencia: juan.tovar@ciad.mx

Artículo aceptado en la revista *New Disease Reports* (14 de septiembre de 2022)

Keywords: *Cicer arietinum*, morphology, pathogenicity, phylogeny

Chickpea (*Cicer arietinum*), is an important legume crop grown mainly in northwest Mexico. In March 2019, wilt symptoms were observed in two fields of chickpea cv. Blanco Sinaloa-92 located in the municipalities of Guasave (Sinaloa) and Comondú (Baja California Sur) in Mexico. Diseased plants showed root rot, reduced growth, chlorosis and wilting of the entire plant (Figure 1). Disease incidence was 15 and 25% in Guasave and Comondú, respectively.

For fungal isolation, symptomatic root pieces were surface sterilised with 2% NaClO for two minutes, rinsed in sterilised distilled water twice, placed on potato dextrose agar (PDA) medium, and incubated at 25°C in darkness for five days. Fungal colonies that had similar morphology were consistently obtained and eight isolates were purified. On PDA, fungal colonies were greenish-white, cottony to felty, while the reverse of the colonies were pale yellow (Figure 2). Microscopic examination showed dimorphic conidiophores (verticillium-like and penicillate). Phialides were in whorls of 2 to 5, and were straight to slightly curved. Conidia ($n=100$) were hyaline, ellipsoidal, slightly curved or asymmetrical, 5.9 to 9.2×4.9 to 6.6 μm , with hilum laterally displaced (Figure 3). Chlamydospores were not observed. Morphological characters matched those of *Clonostachys chloroleuca* (Moreira *et al.*, 2016). Four representative isolates were deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi at the Research Center for Food and Development (Sinaloa, Mexico) under Accession Nos. CCFL106, CCFL112, CCFL121, and CCFL139.

For molecular identification, genomic DNA was extracted, and the internal transcribed spacer (ITS) region and partial sequences of translation elongation factor 1-alpha (*EF1- α*) gene were amplified and sequenced with the primer sets ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) and EF1-728F/EF1-986R (Carbone & Kohn, 1999), respectively. A phylogenetic tree, including published ITS and *EF1- α* sequence datasets for *Clonostachys* spp. was constructed based on Maximum Likelihood (Figure 4). The phylogenetic analysis placed isolates CCFL106, CCFL112, CCFL121, and CCFL139 in the same clade as *Clonostachys chloroleuca*. The sequences were deposited in GenBank under Accession Nos. ON495789–ON495792 for ITS and ON515492–ON515495 for *EF1- α* .

Pathogenicity tests were performed on 20 healthy 15-day-old chickpea seedlings (cv. Blanco Sinaloa-92) grown in pots with a sterile substrate. The roots were washed with sterile distilled water and inoculated by immersion in a spore suspension (1×10^6 conidia/ml) for 10 minutes, placed again in pots, and kept in a greenhouse at a temperature of 25 to 35°C for 30 days. Each isolate was inoculated on five plants and the experiment was repeated twice. The roots of 10 control seedlings were immersed in sterile distilled water. Wilting symptoms were observed on inoculated plants after 25 days, whereas control plants remained symptomless. Pathogenicity testing was performed twice with similar results. The fungi were reisolated from the artificially inoculated plants, thus fulfilling Koch's postulates.

Clonostachys chloroleuca was originally isolated from soil in Brazil (Moreira *et al.*, 2016); however, only *C. rhizophaga* has been previously recorded to cause chickpea wilt in Syria (Abang *et al.*, 2009). To our knowledge, this is the first report of *Clonostachys chloroleuca* causing root rot and wilt of chickpea in Mexico and worldwide.

References

Abang, M. M., Kabbabeh, S., Murad, A. S., Chilvers, M. I., Peever, T. L., Schroers, H. J. (2009) First report of chickpea wilt caused by *Clonostachys rhizophaga* in Syria *Plant Disease*, 93, 666. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0666A>

Carbone, I., Kohn, L. M. (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553–556. <https://doi.org/10.2307/3761358>

Moreira, G. M., Abreu, L. M., Carvalho, V. G., Schroers, H. J., Pfenning, L. H. (2016) Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycological Progress*, 15, 1031–1039. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-016-1224-6>

White, T. J., et al. 1990. Page 315 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

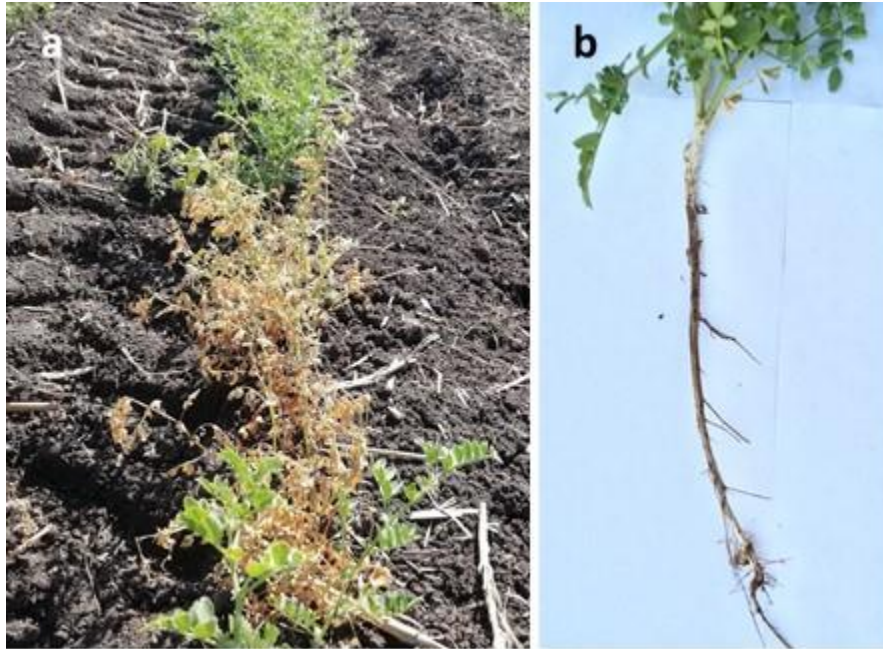


Figure 1: Symptoms caused by *Clonostachys chloroleuca* on chickpea plants: (a) Yellowing and wilt symptoms. (b) Root rot symptom.

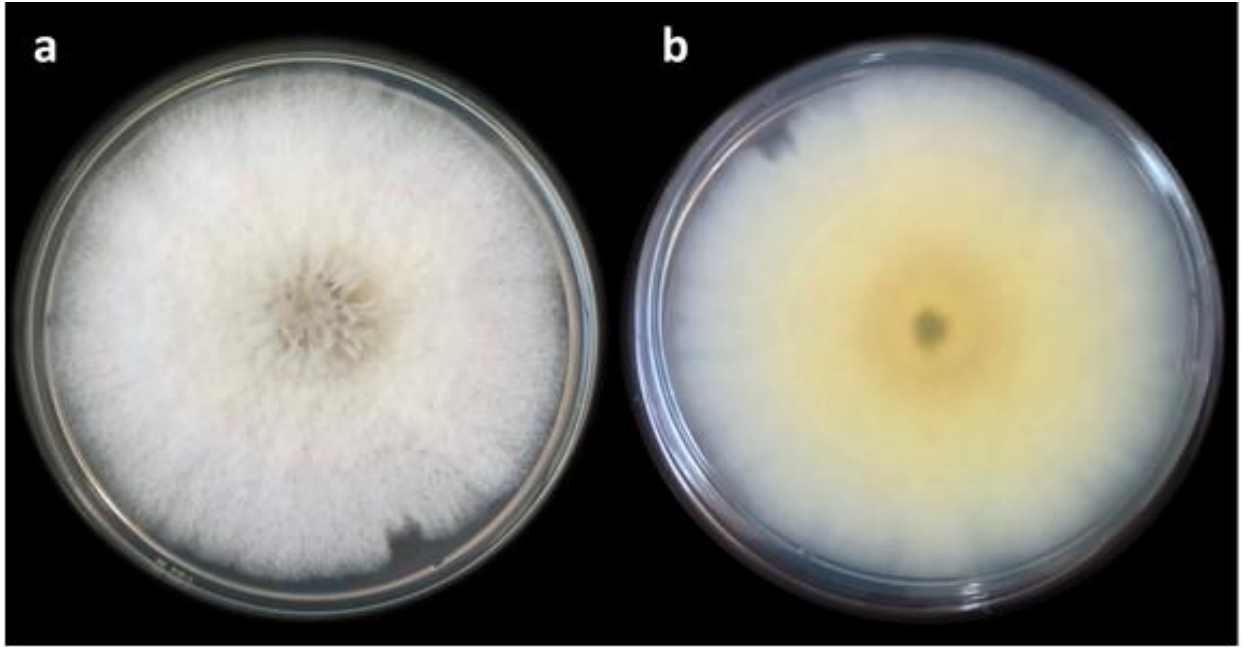


Figure 2: *Clonostachys chloroleuca* (CCLF121): (a) Upper view of colony on PDA after 10 days at 28 °C in the dark (b) Reverse view of colony.

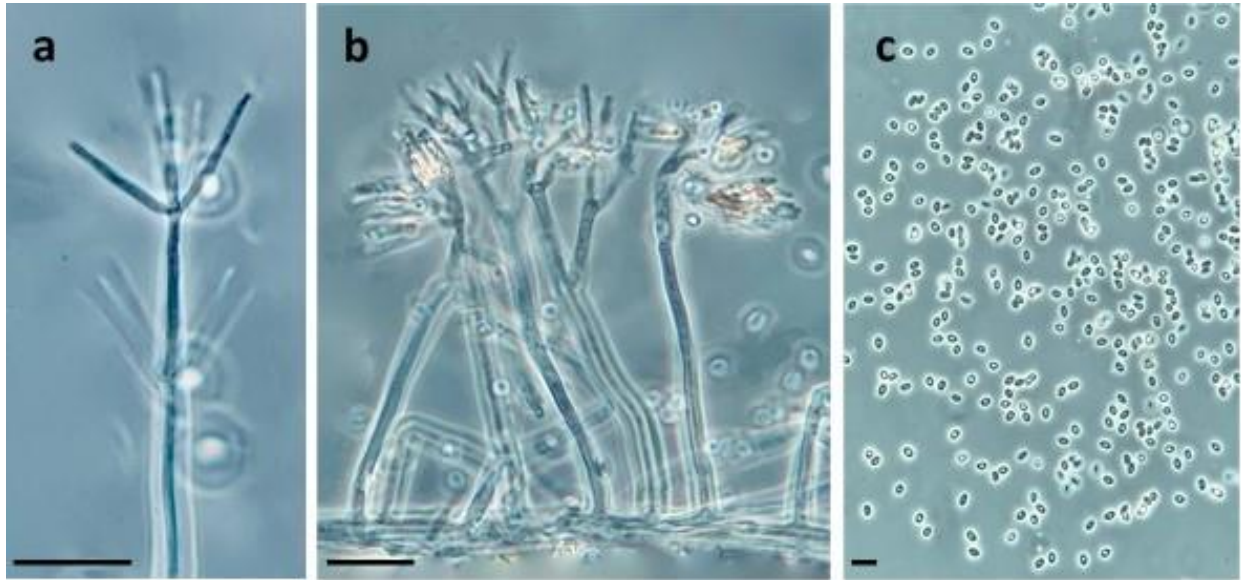


Figure 3: Morphological characters of *Clonostachys chloroleuca*: **(a)** Primary conidiophore. **(b)** Secondary conidiophores. **(c)** Conidia. Scale bars = 20 μm .

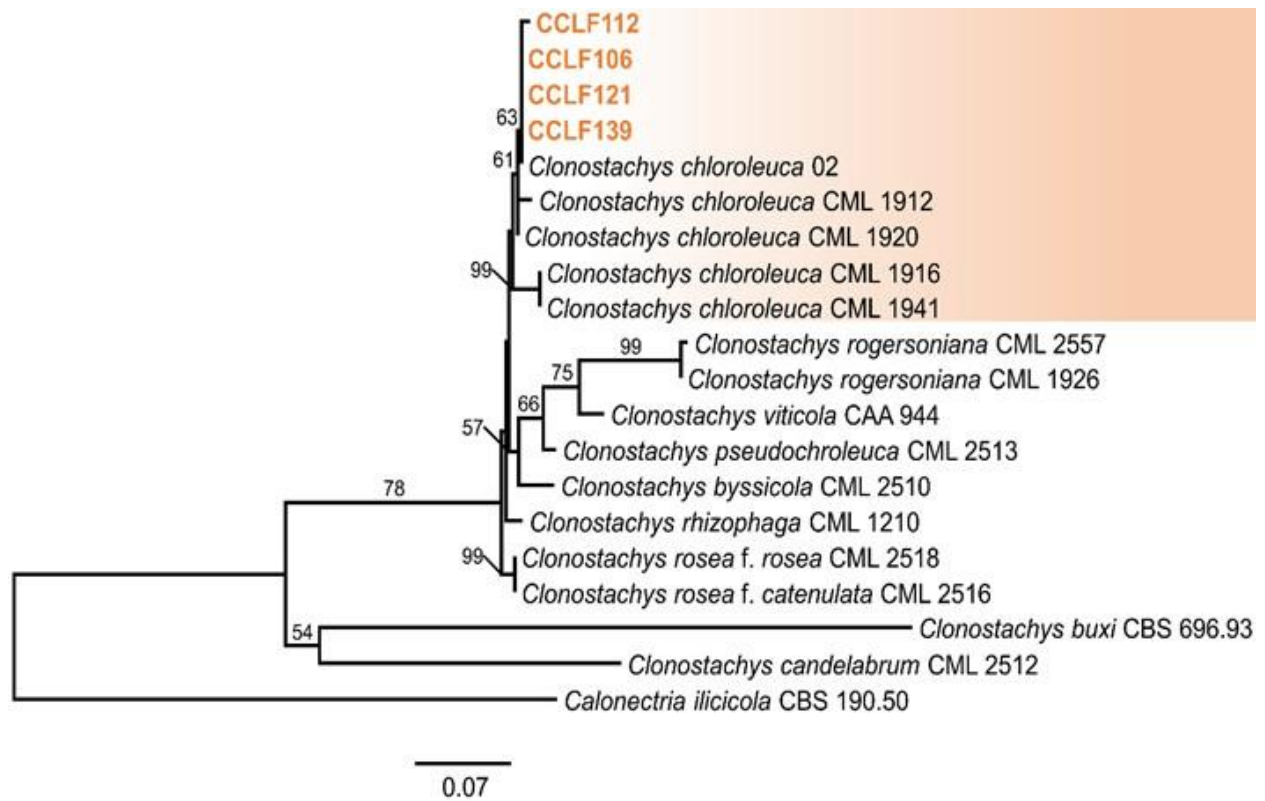


Figure 4: Maximum likelihood phylogenetic tree inferred from a combined alignment of ITS and *EF1- α* sequence data for isolates of *Clonostachys* spp. Bootstrap support values for maximum likelihood greater than 50% are indicated above the nodes. *Calonectria ilicicola* was used as outgroup. Isolates from this study are indicated in orange.

**4. FILOGENIA Y VIRULENCIA DE AISLADOS DE *Fusarium* SPP. Y *Neocosmospora*
falciformis ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL GARBANZO EN EL NOROESTE DE
MÉXICO**

Artículo en preparación

Se pretende enviar a la Plant Disease

4.1. Resumen

La marchitez es la enfermedad más importante que afecta las áreas de producción de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en México. Los síntomas incluyen pudrición de raíz, amarillamiento, reducción de crecimiento y muerte de plantas. Los objetivos de este estudio fueron identificar a las especies de *Fusarium* y *Neocosmospora* asociadas con la marchitez del garbanzo en el noroeste de México mediante análisis filogenético y caracterización morfológica, además de determinar la virulencia de los aislados. Un total de 44 aislados (29 de *Fusarium* y 15 de *Neocosmospora*) representando las diferentes zonas geográficas (estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur). Los análisis filogenéticos se generaron con secuencias nucleotídicas de fragmentos de los genes *EF1- α* y *rpb2*, mediante el método de Máxima Verosimilitud. La caracterización morfológica de aislados representativos de cada especie se llevó a cabo registrando las características cualitativas y cuantitativas de macroconidios, microconidios, fiálides y clamidosporas. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en condiciones de invernadero, inoculando raíces de plantas de garbanzo cv. Blanco Sinaloa 92 con suspensión de esporas. Los análisis filogenéticos generados con los datos combinados de las secuencias *EF1- α* y *rpb2*, permitieron identificar a *Fusarium languescens*, *Neocosmospora falciformis*, *F. nirenbergiae* y *F. verticillioides*. La prueba de patogenicidad indicó que todos los aislados fueron patogénicos y se encontraron diferencias significativas en la virulencia de los aislados. Este es el primer reporte de *F. languescens*, *F. nirenbergiae* y *F. verticillioides* causando marchitez del garbanzo en México y a nivel mundial.

Palabras clave: *Cicer arietinum*, patogenicidad, morfología, análisis de secuencias.

4.2. Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) pertenece a la familia *Fabaceae* y es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial después del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el chícharo (*Pisum sativum*). Asimismo, el garbanzo es una fuente vital de proteína comestible en muchos países en desarrollo (Faruk y Khatun, 2020). El área más probable de origen del garbanzo se considera el sudoeste de Turquía y áreas cercanas a Siria (Samiksha *et al.*, 2021; Dhawale y Dhale, 2021). México se ubica como decimo productor mundial con una producción de 125,823 toneladas, siendo las principales entidades productoras: Sinaloa, Sonora, Michoacán, Guanajuato y Baja California Sur (SIAP, 2021).

Diferentes agentes bióticos y abióticos afectan de manera adversa la productividad del garbanzo alrededor del mundo. Este cultivo es sensible a factores bióticos que engloban una amplia diversidad de agentes patógenos como son hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nematodos. A la fecha, se han reportado al menos 172 patógenos infecciosos en el cultivo de garbanzo (Azevedo *et al.*, 2017; Al-Taae *et al.*, 2021; Babariya y Nath, 2021; Dhawale y Dhale, 2021).

En general, la enfermedad conocida como marchitez, causada por hongos con origen en el suelo, se han asociado principalmente a *Fusarium* y géneros altamente relacionados a *Fusarium* como es el caso de *Neocosmospora*, los cuales son los principales factores limitantes en la producción de garbanzo (Babariya y Nath, 2021) y pueden infectar a la planta en cualquier etapa del ciclo del cultivo (Zhou *et al.*, 2021). La marchitez del garbanzo está presente alrededor del mundo y se ha registrado en países como India, Burma, Bangladesh, Chile, Etiopía, Irán, México, Nepal, Pakistán, entre otros (Dhawale y Dhale, 2021).

La marchitez es una enfermedad caracterizada por su aparición en forma gradual, algunas veces repentina, con síntomas que van desde amarillamiento foliar hasta caída de hojas secas seguido por la marchitez completa de la planta o algunas veces de sus ramas (Hale *et al.*, 2020). Los patógenos causantes de la enfermedad penetran a las raíces provocando pudriciones e invaden el sistema vascular. Generalmente invade solo tejido vivo de raíces, conduciendo a la muerte de la planta y luego prolifera en el tejido muerto (Dandale *et al.*, 2021). Esta enfermedad reduce la producción de garbanzo por la disminución del rendimiento y peso de grano. Las pérdidas pueden llegar hasta 70% del total de la cosecha (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

La identificación basada en morfología de especies de *Fusarium* se apoyaba en un número limitado de caracteres taxonómicos con diferencias menores en la morfología y que están influenciados por las condiciones ambientales, lo cual hace difícil la identificación a nivel de especie (Tekeoğlu *et al.*, 2017; Younesi *et al.*, 2021). Por lo tanto, las técnicas moleculares se usan para superar las limitaciones de la identificación mediante morfología (Younesi *et al.*, 2021), ya que son más confiables para la identificación de especies conocidas, además evaluar la diversidad genética, y para el descubrimiento de nuevas especies crípticas dentro de complejos de especies que previamente se describieron como especies (Zhou *et al.*, 2018; Dongzhen *et al.*, 2020).

La identificación de *Fusarium* a nivel de especie es esencial para clarificar al agente causal y con ello determinar las estrategias de manejo de la enfermedad (Zhou *et al.*, 2021). Para la identificación a nivel de especie, la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADNr se han usado comúnmente para muchas especies de hongos (Hadi y İnal, 2019); sin embargo, actualmente la región ITS no permite diferenciar a la gran diversidad de especies de *Fusarium* filogenéticamente relacionadas, causando dificultad en la resolución de especies cuando se utilizan estas secuencias (Hadi y İnal, 2019; Crous *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021; Mirghasempour *et al.*, 2022).

El género *Fusarium* se incluyó en una lista dentro de los 10 géneros más importantes de hongos fitopatógenos, basado en percepciones científicas e importancia económica, en particular debido a los complejos de especies filogenéticas de *F. graminearum* (FGSC) y *F. oxysporum* (FOSC) (Dean *et al.*, 2012). La evidencia filogenética mostró desde hace tiempo que *F. oxysporum* es un complejo de múltiples especies crípticas (Laurence *et al.*, 2014); el término “complejo de especies” se introdujo para nombrar clados filogenéticos (Yilmaz *et al.*, 2021). Otras especies de *Fusarium* impactantes incluyen a *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, así como *Neocosmospora solani* sensu stricto y otros miembros del complejo de especies *Neocosmospora solani* (Anteriormente *Fusarium Solani* Species Complex) (Sandoval-Denis *et al.*, 2018).

El género *Neocosmospora* incluye hongos que están presentes en todas partes y ampliamente distribuidos en el suelo, restos de plantas, material vegetal vivo, aire y agua (Sandoval-Denis *et al.*, 2019). El complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC por sus siglas en inglés) es uno de los complejos de especies más grande y mejor estudiados dentro del género que muestra varias ecologías e incluye al menos 50 especies distintas que se agrupan dentro de tres clados: americana, africana y asiática (Yilmaz *et al.*, 2021).

En México y a nivel mundial, se ha reportado comúnmente a *F. oxysporum* y *F. solani* como unos de los principales agentes patógenos causantes de la marchitez del garbanzo, sin embargo, no se han realizado estudios detallados sobre la identidad filogenética y virulencia de las diversas especies crípticas pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Neocosmospora* que pueden estar involucradas. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente a diversos aislados de *Fusarium* y *Neocosmospora* asociados a la marchitez del garbanzo en campos comerciales distribuidos en los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, México.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Recolección de muestras

Durante el ciclo 2018–2019, en 17 lotes comerciales distribuidos en los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, México (Figura 1), se realizaron cinco muestreos dirigidos y se recolectaron plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez, así como pudrición de raíces. Las etapas en las que se realizaron los muestreos fueron en desarrollo, floración y formación de grano. Además, se registraron las coordenadas con un GPS de cada uno de los lotes donde se realizó la recolección de plantas sintomáticas.



Figura 1. Síntomas en plantas de garbanzo causados por aislados de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis*. **(A)** Lote comercial de garbanzo con alta incidencia de la enfermedad. **(B)** Plantas con síntomas de amarillamiento. **(C)** Plantas con síntomas de marchitez y muerte. **(D)** Lesión en tallo. **(E)** Pudrición de raíz.

4.3.2. Aislamiento, purificación y conservación de hongos

Los aislados fúngicos del presente estudio se obtuvieron mediante los procedimientos descritos por Crous *et al.* (2009). Para ello se cortaron piezas de raíces de 5 mm de longitud de la zona de transición entre el tejido enfermo y sano, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% por 2 min, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril por 1 min y se secaron con papel absorbente estéril. Posteriormente, las piezas desinfectadas se colocaron en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco, EE.UU.). Las placas Petri se mantuvieron en incubación a 25°C bajo condiciones de oscuridad durante 72 h. Una vez transcurrido el tiempo, se transfirieron discos miceliales (5 mm de diámetro) del borde de los crecimientos activos de colonias con características de *Fusarium* y *Neocosmospora* a placas Petri con PDA fresco y se

incubaron a 25°C por siete días. Los cultivos puros se obtuvieron mediante la técnica de cultivo monospórico en medio de cultivo agua agar (AA) y se transfirieron a placas con medio PDA fresco. Un total de 68 aislados usados en el presente estudio se encuentran conservados en el Laboratorio de Fitopatología del Centro en Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán (Culiacán, Sinaloa, México) con número de acceso CCLF78–CCLF146. Discos miceliales de los aislados fúngicos se conservaron en agua destilada estéril a 4°C para almacenamiento a corto plazo, además de colocarse en tubos con arena, así como en tubos criogénicos de 2 mL de conteniendo glicerol al 10% y a -20°C para almacenamiento a largo plazo. Del total de 68 aislados, de todos los lotes comerciales de garbanzo en las tres entidades, se eligieron 44 aislados fúngicos representativos (Cuadro 1) para los estudios de filogenia y virulencia.

Cuadro 1. Datos de aislados fúngicos obtenidos de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez en campos de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, México, durante el ciclo de cultivo 2018–2019.

Código de aislado	Sitio	Origen	Fecha de recolección
CCLF78	14	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF79	5	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF80	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF81	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF82	12	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF84	17	Comondú, Baja California Sur	Marzo 2019
CCLF85	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF88	17	Comondú, Baja California Sur	Marzo 2019
CCLF90	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF91	7	Salvador Alvarado, Sinaloa	Enero 2019
CCLF95	13	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF96	1	Culiacán, Sinaloa	Enero 2019
CCLF97	12	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF99	15	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF101	3	Angostura, Sinaloa	Enero 2019
CCLF102	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF103	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF105	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF107	2	Mocorito, Sinaloa	Enero 2019
CCLF110	6	Salvador Alvarado, Sinaloa	Enero 2019
CCLF111	9	Salvador Alvarado, Sinaloa	Febrero 2019

CCLF113	1	Culiacán, Sinaloa	Enero 2019
CCLF114	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF115	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF117	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF118	5	Guasave, Sinaloa	Enero 2019
CCLF120	5	Guasave, Sinaloa	Enero 2019
CCLF122	4	Salvador Alvarado, Sinaloa	Enero 2019
CCLF123	12	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF124	17	Comondú, Baja California Sur	Marzo 2019
CCLF125	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF127	13	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF128	15	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF129	8	Salvador Alvarado, Sinaloa	Enero 2019
CCLF130	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF133	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF134	10	Salvador Alvarado, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF136	12	Guasave, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF137	11	Salvador Alvarado, Sinaloa	Febrero 2019
CCLF138	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF142	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF144	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF145	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019
CCLF146	16	Hermosillo, Sonora	Junio 2019

4.3.3. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

La extracción del ADN se realizó a partir de colonias fúngicas de 7 días de edad y cultivadas en medio PDA. El micelio de cada aislado se raspó con un portaobjetos estéril, se maceró en un mortero estéril usando nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL conteniendo 500 µL de solución buffer (Tris 100 mM pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, NaCl 1.4 M, 3 % CTAB), se mezcló con vórtex por 10 s y se incubó por 60 min a 65 °C. Se agregaron 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1v/v), se pasaron por vórtex por 10 s y se colocó en una centrifuga 5810 R (Eppendorf, EE. UU.) a 13000 g durante 10 min. Después, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se agregaron 700 µL de isopropanol. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenaron a -20 °C durante 10 min. Luego, se centrifugó a 13000 g durante 10 min para sedimentar el DNA y desechar el sobrenadante.

Posteriormente, se agregaron 500 μ L de etanol al 70 % a cada tubo, se centrifugó a 13000 g por 5 min y se desechó de nuevo el sobrenadante. Los tubos se colocaron sobre papel secante hasta que el etanol se evaporó, y cuando la pastilla se secó, se procedió a agregar 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y concentración del ADN se cuantificó con un espectrofotómetro–Q–3000 UV (Quawell, EE. UU.). El DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Para la PCR se utilizaron los iniciadores correspondientes al factor de elongación de la traducción 1- α (*TEF1- α*) (EF1-728F-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG, EF1-986R-ACTTGAAGGAACCCTTACC) (O'Donnell *et al.*, 1998) y para la segunda subunidad grande de la ARN polimerasa (*rpb2*) (RPB2-5F2-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC), RPB2-7CR-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT) (Liu *et al.*, 1999). La mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 25 μ L para la amplificación de *rpb2* y de 22 μ L para la amplificación de *TEF1- α* . La mezcla contenía buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 0.4 μ M de cada iniciador, 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 4 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE. UU.) con las siguientes condiciones para la amplificación de un fragmento del gen *TEF1- α* : una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 30 s; y una extensión final a 72°C por 5 min; mientras que, las condiciones para la amplificación de parte del gen *rpb2* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 38 ciclos de 95°C por 40 s, 55°C por 40 s, 72°C por 1:15 min; y una extensión final de 72°C por 5 min. La temperatura de alineamiento para los iniciadores EF1-728F/EF1-986R y RPB2-5F2/RPB2-7CR fueron 54 y 55°C , respectivamente. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X. Se usaron 7 μ L del producto de PCR y 3 μ L de buffer de carga, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad, EE. UU.). Los amplicones se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen EE. UU.) y ambas direcciones se secuenciaron en la empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur) usando los mismos iniciadores que se utilizaron para la amplificación. Todas las secuencias generadas en este estudio se depositaron en la base de datos del GenBank.

4.3.4. Análisis filogenético

Las secuencias se editaron con el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y se compararon en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLASTn. Las secuencias de cada región/gen se alinearon de manera independiente utilizando el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). En todos los casos, se utilizaron como referencia las secuencias de aislados pertenecientes a colecciones microbiológicas internacionales y cuando fue posible, clasificados bajo la designación nomenclatural Ex-tipo (T), Ex-epitipo (ET) o Neotipo (NT). Los alineamientos se concatenaron en MEGA 11 y el mejor esquema de particiones para cada alineamiento se evaluó en PartitionFinder v 1.1.1 (Lanfear *et al.* 2012), empleando el algoritmo greedy y el criterio de información de Akaike corregido (AICc). La reconstrucción filogenética se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud en RAXML v 7.2.8 (Stamatakis 2006), con el modelo GTRGAMMAI y 1000 bootstrap. Los filogramas se editaron en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

4.3.5. Prueba de patogenicidad y virulencia

La patogenicidad de los 44 aislados fúngicos seleccionados se verificó mediante la inoculación de plántulas de garbanzo de un genotipo susceptible (Blanco Sinaloa 92) bajo condiciones de invernadero. Para la preparación del inóculo, cada aislado de *Fusarium* y *Neocosmospora* se cultivaron en medio PDA a 25°C durante 10 días. Después, el crecimiento micelial se raspó superficialmente con un portaobjetos, se colocó en agua destilada estéril y se licuó por 10 s. La suspensión del inóculo se ajustó a una concentración de 1×10^5 fragmentos miceliales mL⁻¹ y se le adicionó Tween 20®. Las raíces de plántulas de garbanzo de 15 días de edad se inocularon por inmersión en la suspensión de fragmentos miceliales por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, las plántulas se colocaron nuevamente en las charolas con sustrato estéril y se mantuvieron en un invernadero a temperatura de 20 a 35°C.

La observación del progreso de los síntomas se realizó diariamente y la evaluación de la severidad

de la enfermedad se realizó 30 días después de la inoculación usando una escala visual de 5 categorías, donde 0 = síntomas no visibles, 1 = $\leq 25\%$ de follaje enfermo, 2 = 25 a 50% de follaje enfermo, 3 = 50 a 75% de follaje enfermo, 5 = $\geq 75\%$ de follaje enfermo. Los valores de la escala se transformaron a valores porcentuales y se analizaron. Primero se verificó la normalidad y homogeneidad de la varianza mediante la prueba Shapiro-Wilk y la prueba Levene, respectivamente. Las varianzas de los dos experimentos no fueron estadísticamente diferentes para cada prueba; por lo tanto, los datos de las dos repeticiones de cada experimento se combinaron para posteriores análisis. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher con una probabilidad de 5%, usando PROC GLM en SAS (versión 9.3; SAS Institute, Cary, NC). Los datos de las plantas control (no inoculadas) se excluyeron del análisis estadístico.

4.3.6. Caracterización morfológica

Aislados representativos de cada especie de *Fusarium* y *Neocosmospora* identificadas mediante filogenia, se caracterizaron con bases en sus caracteres culturales y morfológicos. La morfología de la colonia, pigmentación y tipo de micelio aéreo se observaron en los medios de cultivo PDA y SNA. Las observaciones morfológicas incluyeron las características cuantitativas y cualitativas de macroconidios, microconidios, fiálides y clamidosporas.

4.4. Resultados

4.4.1. Análisis filogenético

El análisis filogenético inferido bajo el criterio de Máxima Verosimilitud proporcionó suficiente información para distinguir entre especies crípticas de *Fusarium* y *Neocosmospora* utilizando

secuencias de los genes *TEF1- α* y *rpb2*. De los 44 aislados analizados, 29 se agruparon al género de *Fusarium* distribuidos en dos complejos de especies conocidos, incluyendo al complejo *Fusarium oxysporum* (27 aislados) y *F. fujikuroi* (dos aislados). Dentro del complejo de especies *Fusarium oxysporum*, 24 aislados (CCLF78, CCLF81, CCLF82, CCLF84, CCLF85, CCLF88, CCLF90, CCLF91, CCLF95, CCLF96, CCLF97, CCLF99, CCLF107, CCLF117, CCLF120, CCLF123, CCLF124, CCLF125, CCLF128, CCLF129, CCLF136, CCLF138, CCLF142 y CCLF146) se agruparon con *F. languescens* y tres aislados (CCLF79, CCLF111 y CCLF118) como *F. nirenbergiae* (Figura 2). En el caso del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*, los dos aislados (CCLF101 y CCLF113) se identificaron como *F. verticillioides* (Figura 3). Referente al género *Neocosmospora*, el análisis filogenético reveló que los 15 aislados (CCLF80, CCLF102, CCLF103, CCLF105, CCLF110, CCLF114, CCLF115, CCLF122, CCLF127, CCLF130, CCLF133, CCLF134, CCLF137, CCLF144, CCLF145) corresponden con la especie *N. falciformis* (Figura 4).

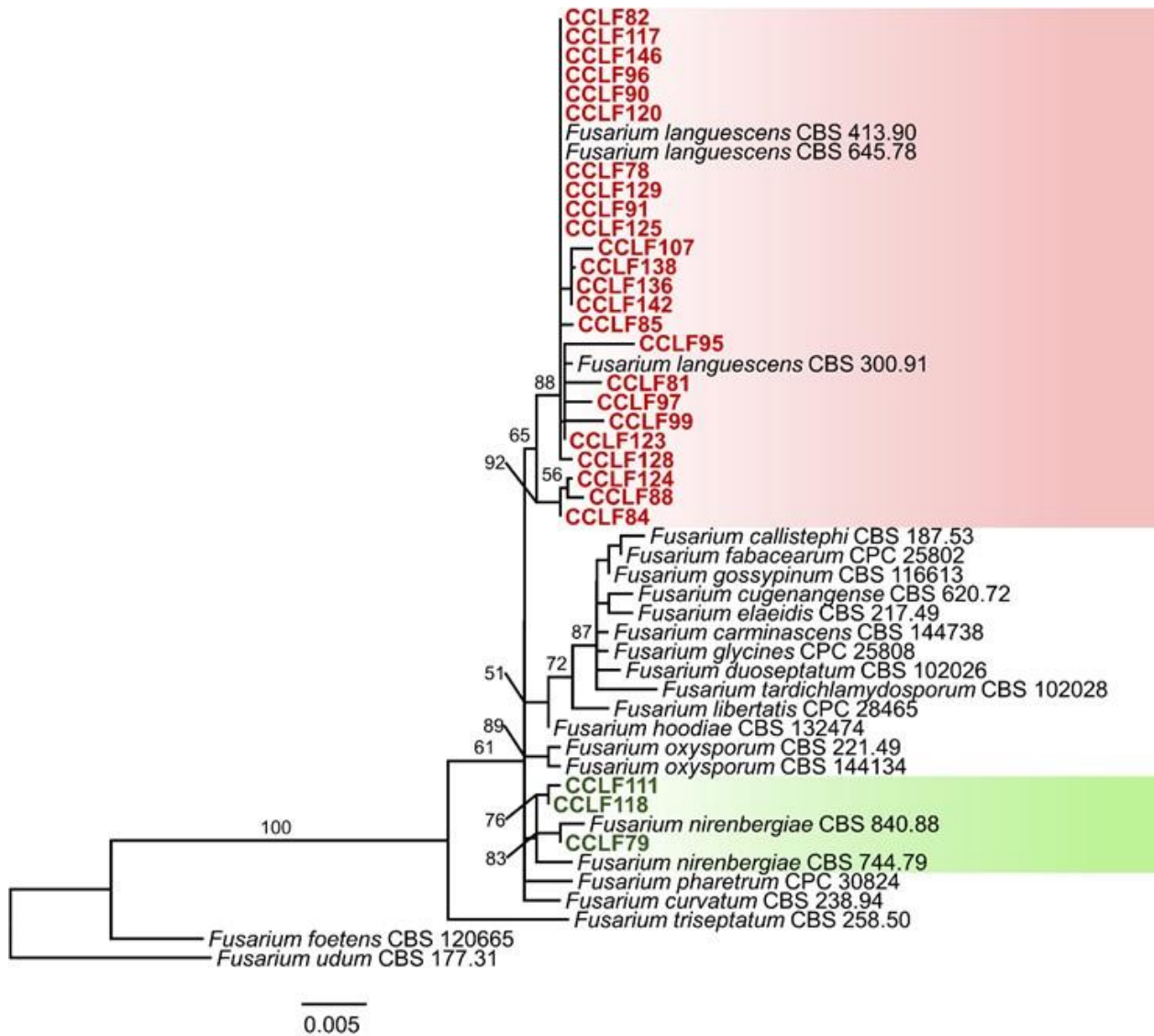


Figura 2. Árbol filogenético basado en el método de Máxima Verosimilitud e inferido de una alineación de datos combinados de secuencias *rpb2* y *TEF1-α* para aislados pertenecientes al complejo de especies *Fusarium oxysporum*. Los valores bootstrap superiores al 50% se indican en los nodos. Como grupos externos se utilizaron a *Fusarium foetens* y *F. udum*. Los aislados de este estudio se indican en rojo y verde.

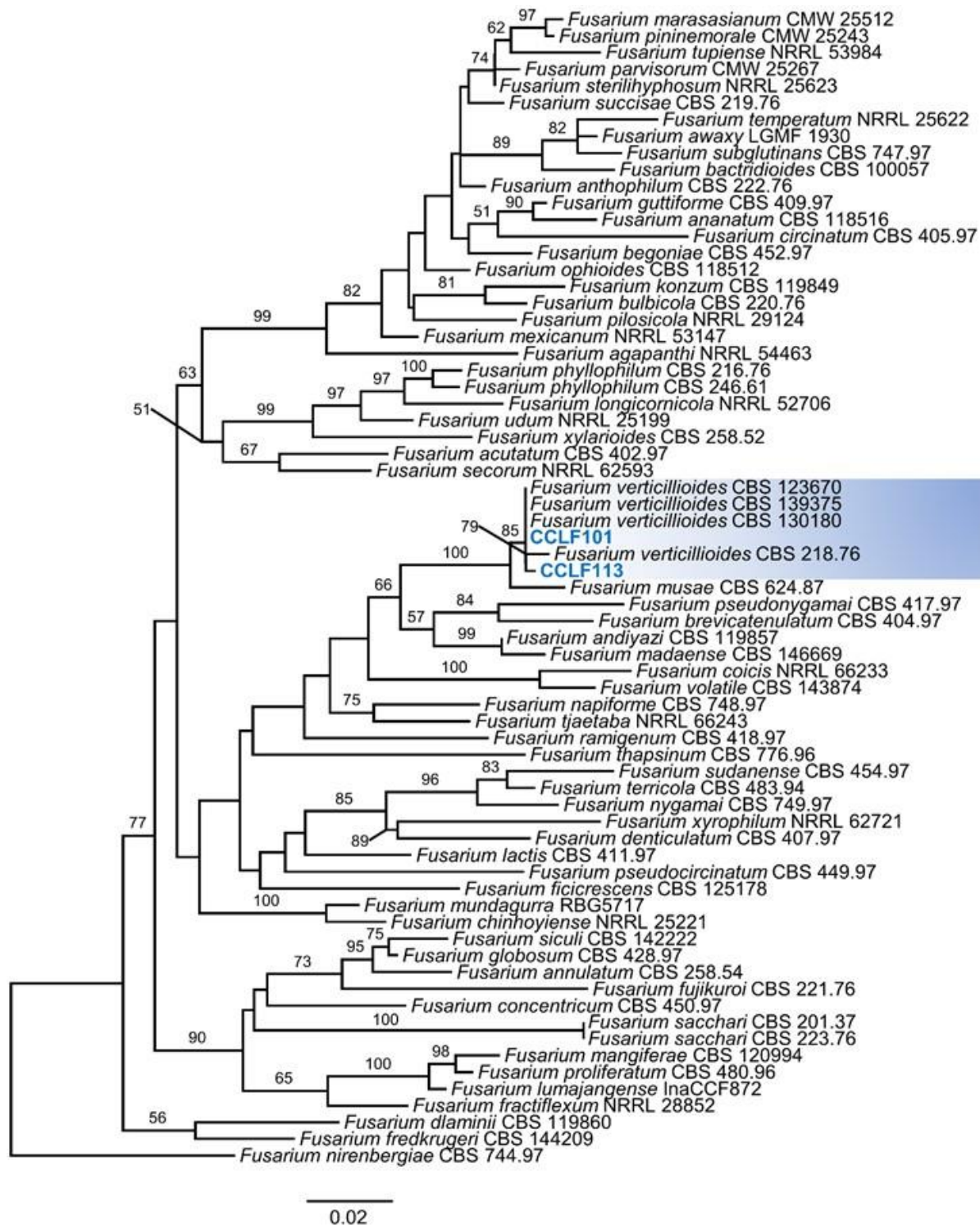


Figura 3. Árbol filogenético basado en el método de Máxima Verosimilitud e inferido de una alineación de datos combinados de secuencias *rpb2* y *TEF1- α* para aislados pertenecientes al complejo de especies *Fusarium fujikuroi*. Los valores bootstrap superiores al 50% se indican en los nodos. Como grupo externo se utilizó *Fusarium nirenbergiae*. Los aislados de este estudio se indican en azul.

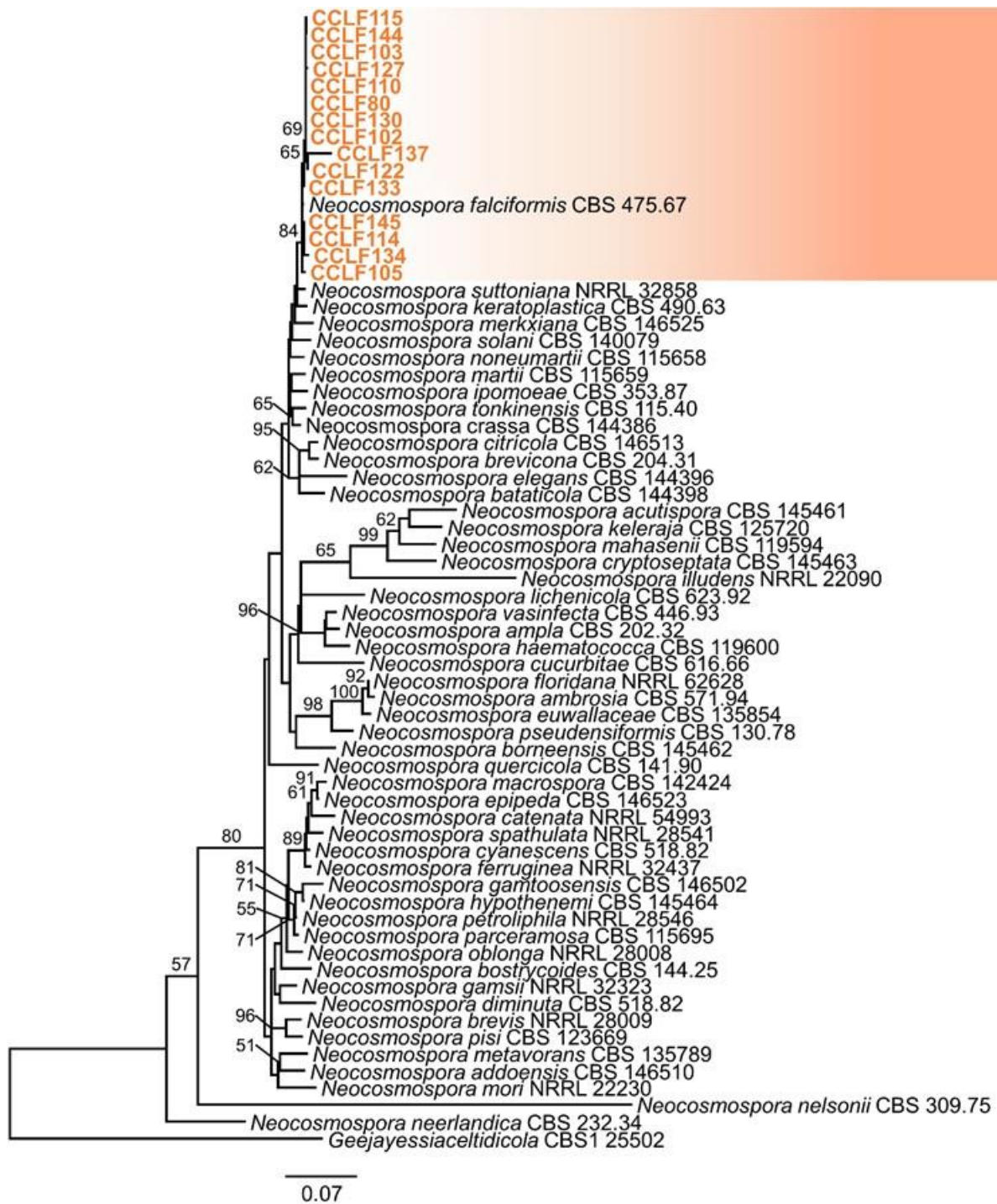


Figura 4. Árbol filogenético basado en el método de Máxima Verosimilitud e inferido de una alineación de datos combinados de secuencias *rpb2* y *TEF1-α* para aislados de *Neocosmospora* spp. Los valores bootstrap superiores al 50% se indican en los nodos. Como grupo externo se utilizó *Geejayessia celtidicola*. Los aislados de este estudio se indican en naranja.

4.4.2. Distribución de especies fúngicas

En el estado de Sinaloa, *F. languescens* se encontró en los municipios de Guasave, Mocorito, Salvador Alvarado y Culiacán, siendo la especie más común. Respecto a *N. falciformis* y *F. nirenbergiae*, estas especies se presentaron en los municipios de Guasave y Salvador Alvarado. Mientras que, *F. verticillioides* se distribuyó en los municipios de Angostura y Culiacán (Figura 5).

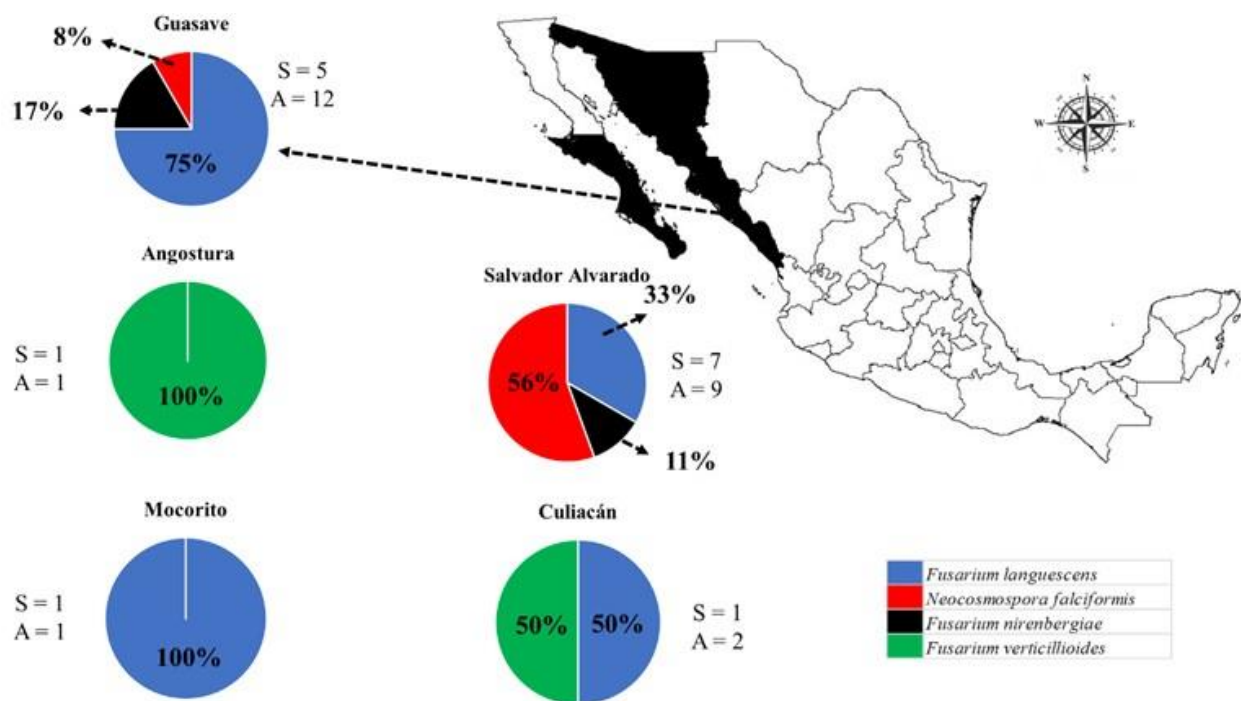


Figura 5. Distribución de especies de *Fusarium* y *Neocosmospora* por municipio en el estado de Sinaloa.

En el estado de Sonora, únicamente se recolectaron muestras de un sitio, en el cual se encontró a *F. languescens* y *N. falciformis*, siendo esta última especie la más común. En el caso de Baja California Sur, solamente se identificó la presencia de *F. languescens* (Figura 6).

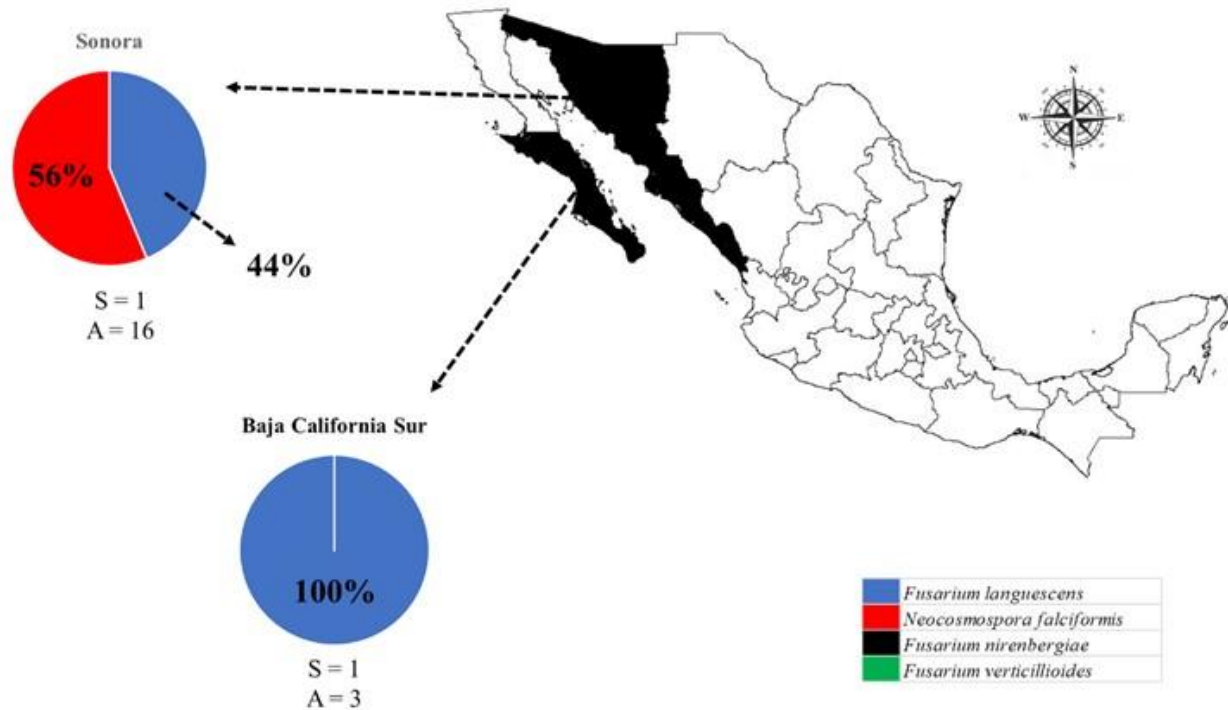


Figura 6. Distribución de especie de *Fusarium* y *Neocosmospora* en los estados de Sonora y Baja California Sur.

4.4.3. Caracterización morfológica

Fusarium languescens (aislado CCLF128) produjo colonias con crecimiento micelial de 7.4 mm/día en medio PDA, además, mostró crecimiento micelial blanco al inicio, pero con el paso del tiempo se tornó de color ligeramente violeta y con abundante micelio aéreo; mientras que, el color del inverso de la colonia fue cremoso con ligera pigmentación violeta. En medio SNA, las fiálides fueron subuliformes a subcilíndricas con paredes lisas y delgadas. Los macroconidios fueron falcados, de $32.5\text{--}44.1 \times 3.0\text{--}3.7 \mu\text{m}$ y curvados dorsoventralmente con lados casi paralelos que se estrechan ligeramente hacia ambos extremos. Los microconidios se formaron en falsas cabezas pequeñas en la punta de las fiálides, y estos fueron hialinos, elipsoidales a falcados, de $5.0\text{--}7.6 \times 2.0\text{--}3.1 \mu\text{m}$ y con paredes lisas y delgadas. Las clamidosporas fueron globosas a subglobosas y formadas terminalmente.

Neocosmospora falciformis (aislado CCLF133) presentó un crecimiento micelial de 7.9 mm/día en

PDA y exhibió crecimiento micelial principalmente blanco, con ligero micelio aéreo, y el color inverso de la colonia fue cremoso. En SNA, las fiálides fueron subcilíndricas y con 1 a 3 monofiálides. Los macroconidios fueron ligeramente fusoides, de $32.7\text{--}47.1 \times 3.2\text{--}5.1 \mu\text{m}$, con 2 a 3 septos y con células terminales curvadas o dobladas. Los microconidios fueron elípticos y midieron $7.4\text{--}13.6 \times 2.6\text{--}4.9 \mu\text{m}$. Las clamidosporas fueron globosas a subglobosas, de $6.4\text{--}8.4 \times 6.5\text{--}10.2 \mu\text{m}$, con paredes gruesas y lisas, se observaron individualmente o en cadenas cortas.

Fusarium nirenbergiae (aislado CCLF111) produjo colonias con crecimiento micelial de 7.8 mm/día en PDA y mostró un crecimiento inicialmente blanco, pero se tornó de color ligeramente violeta después de 5 días, con abundante micelio aéreo y el color del inverso de la colonia fue cremoso con pigmentación violeta. En SNA, las fiálides fueron subuliformes a subcilíndricas, de paredes lisas y delgadas. Los macroconidios fueron falcados, de $21.6\text{--}35.4 \times 2.5\text{--}4.1 \mu\text{m}$, curvados dorsoventralmente con los lados casi paralelos que se estrechan ligeramente en ambos extremos. Los microconidios fueron abundantes, ovalados, de $4.2\text{--}8.7 \times 1.6\text{--}2.7 \mu\text{m}$, con 1 a 2 células y desarrollados en monofiálides cortas. Las clamidosporas fueron globosas, de $4.2\text{--}14.2 \times 4.1\text{--}14.5 \mu\text{m}$, con paredes lisas y gruesas, intercaladas o solitarias, comúnmente solas, pero a veces en cadena.

Fusarium verticillioides (aislado CCLF113) presentó colonias con crecimiento micelial de 8.0 mm/día en PDA y se exhibió un crecimiento micelial blanco, pero con el paso del tiempo cambio a rosáceo-violeta, con abundante micelio aéreo afelpado; mientras que, el color inverso de la colonia fue naranja-amarillento. Las fiálides estuvieron dispuestas en cadenas largas y monofiálides. Los macroconidios fueron ligeramente falcados a casi rectos y midieron de $30.3\text{--}44.6 \times 3.5\text{--}4.7 \mu\text{m}$. Los microconidios fueron ovalados con la base aplanada y midieron $13.5\text{--}18.6 \times 2.7\text{--}3.9 \mu\text{m}$ (Figura 7). No se observaron clamidosporas.

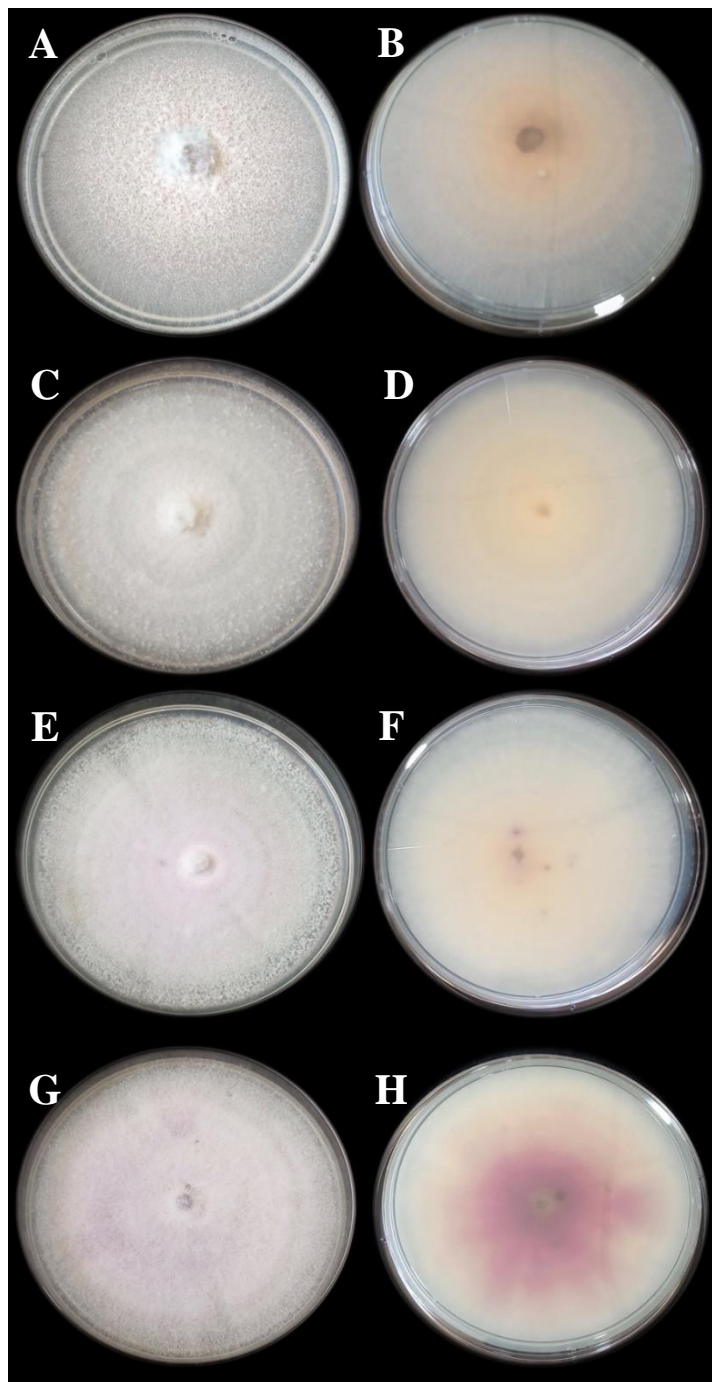


Figura 7. Morfología de colonias de los aislados de *Fusarium* spp., y *Neocosmospora falciformis*. **(A)** *F. verticillioides* (CCLF113) parte superior de la colonia. **(B)** *F. verticillioides* (CCLF113) parte inferior. **(C)** *N. falciformis* (CCLF133) parte superior de la colonia. **(D)** *N. Falciformis* (CCLF133) parte inferior. **(E)** *F. languescens* (CCLF128) parte superior de la colonia. **(F)** *F. languescens* (CCLF128) parte inferior. **(G)** *F. nirenbergiae* (CCLF111) parte superior de la colonia. **(H)** *F. nirenbergiae* (CCLF111) parte inferior.

4.4.4. Patogenicidad y virulencia

Todas las plantas de garbanzo inoculadas presentaron síntomas de amarillamiento y defoliación prematura a los 30 días después de la inoculación, mientras que las plantas control (no inoculadas) permanecieron libres de la enfermedad, lo que confirmó la patogenicidad de los aislados de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis* (Figura 8).

El análisis estadístico mostró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la virulencia de los aislados de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis*. Los aislados que presentaron mayor grado de virulencia fueron: CCLF115 (*N. falciformis*), CCLF85 (*F. languescens*), CCLF99 (*F. languescens*), CCLF144 (*N. falciformis*) y CCLF123 (*F. languescens*) con valores de severidad de 82.13, 80.36, 78.57, 78.57 y 78.57%, respectivamente. Cabe mencionar, que los aislados CCLF115, CCLF85 y CCLF144 se obtuvieron de Sonora, mientras que, los aislados CCLF99 y CCLF123 se obtuvieron de campos de Sinaloa. Los aislados que presentaron menor grado de virulencia fueron: CCLF134 (*N. falciformis*), CCLF133 (*N. falciformis*), CCLF130 (*N. falciformis*), CCLF125 (*F. languescens*) y CCLF128 (*F. languescens*) con porcentajes de severidad de 48.21, 48.21, 48.21, 46.43 y 42.86%, respectivamente. Dentro de estos, los aislados CCLF133, CCLF130 y CCLF125 se obtuvieron de Sonora, mientras que, los aislados CCLF134 y CCLF128 se obtuvieron de Sinaloa (Figura 9).



Figura 8. Plantas de garbanzo cv. Blanco Sinaloa 92 inoculadas artificialmente con *Fusarium languescens*. (A) Síntomas en plantas de garbanzo, 30 días después de la inoculación. (B) Plantas control (no inoculadas).

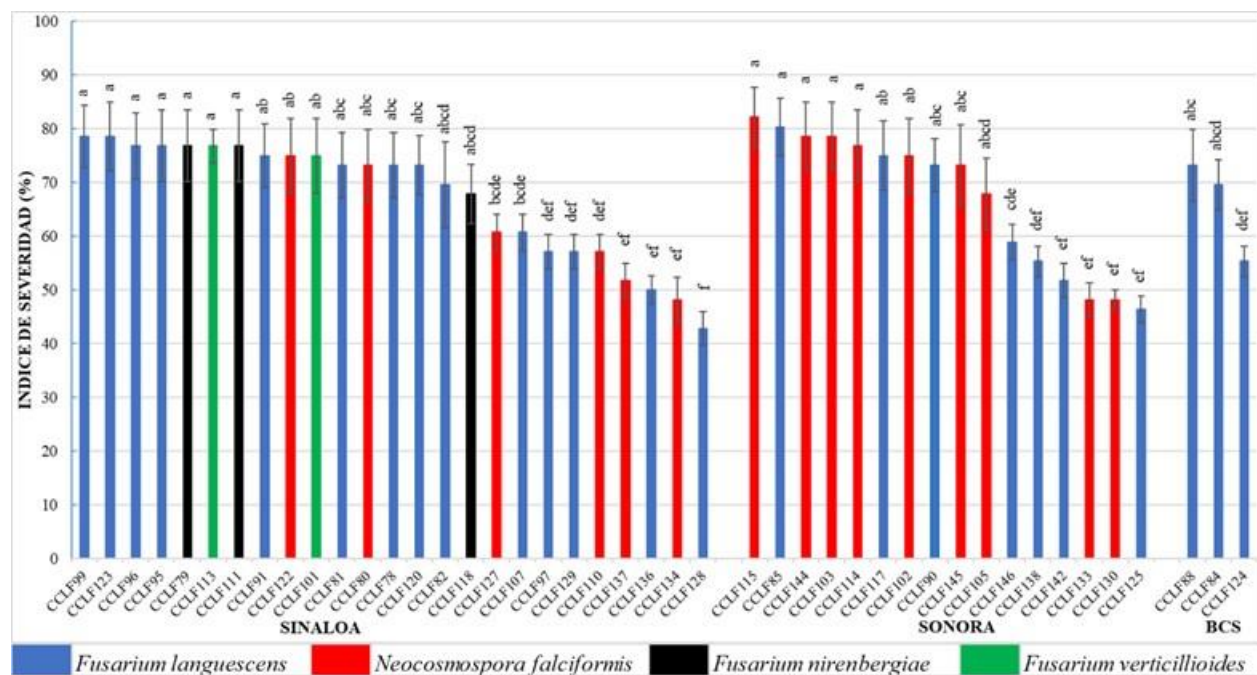


Figura 9. Severidad de la enfermedad 30 días después de la inoculación en raíces de garbanzo cv. Blanco Sinaloa 92 causada por aislados de *F. languescens*, *N. falciformis*, *F. nirenbergiae* y *F. verticillioides* obtenidos de lotes comerciales en Sinaloa, Sonora y Baja California Sur. Las barras de error representan el error estándar. Columnas con la misma letra no muestran diferencia significativa, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher ($P \leq 0.05$).

4.5. Discusión

En este estudio, se comprobó que *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis* son parte del complejo de hongos causantes de amarillamiento y marchitez en plantas de garbanzo en el noroeste de México. De manera similar, diversos estudios a nivel mundial reportaron a especies de *Fusarium* y *Neocosmospora* como causantes de diversas enfermedades, incluyendo pudrición en especies de la familia *Cactaceae*, pudrición de corona y cancro del tallo en pistacho, así como marchitez,

podrición de raíz, clorosis de hojas y damping-off en ornamentales (Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Crespo *et al.*, 2019; Guarnaccia *et al.*, 2019; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2022).

De manera general, en este trabajo se obtuvieron aislados pertenecientes al género de *Fusarium* en una mayor proporción en comparación a los del género *Neocosmospora*. No obstante, en los aislados obtenidos del estado de Sonora, se obtuvo un mayor porcentaje de aislados de *Neocosmospora* que de *Fusarium*. Esto contrasta a lo reportado por Fierros-Leyva *et al.* (2019), quienes registraron un mayor número de aislados de *Fusarium* asociados a síntomas de marchitez en garbanzo, en comparación con aislados de *F. solani* (actualmente *Neocosmospora*). Esto se debe estudiar en investigaciones posteriores para poder determinar la situación y distribución de ambos géneros de hongos fitopatógenos.

Los análisis filogenéticos realizados en este estudio con secuencias concatenadas *TEF1- α* y *rpb2*, permitieron distinguir con alto soporte a *F. languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides* y *Neocosmospora falciformis*, como las especies asociadas a la marchitez del garbanzo. En este sentido, algunos estudios recientes han identificado especies de *Fusarium* y *Neocosmospora* con base en análisis filogenético multilocus usando un conjunto de datos de secuencias de los marcadores *Cal*, *TEF1- α* , *IGS*, *rpb2* y *Tub2*; sin embargo, se ha demostrado que las secuencias *TEF1- α* y *rpb2* son las que proporcionan la mejor resolución filogenética para discriminar especies crípticas dentro de ambos géneros de hongos (Crespo *et al.*, 2019; Lombard *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2021; Crous *et al.*, 2021; Mirghasempour *et al.*, 2022).

Dentro de las especies de *Fusarium* identificadas filogenéticamente, en este estudio *F. languescens* fue la especie más frecuentemente aislada y distribuida en las muestras de los tres estados del noroeste de México. Asimismo, todos los caracteres culturales y morfológicos del aislado representativo coincidieron con los reportados por Lombard *et al.* (2019). Esta especie fúngica se describió por primera vez como asociada a marchitez de tomate (*Solanum lycopersicum*) en Marruecos, Israel y Países Bajos, así como en maíz en Sudáfrica (Lombard *et al.*, 2019). Por lo que, para nuestro conocimiento, este es el primer reporte a nivel mundial de *F. languescens* como patógeno del garbanzo.

Respecto a la inoculación de los 29 aislados de *Fusarium* spp. y 15 de *Neocosmospora* en plantas de garbanzo, se comprobó que todos fueron patogénicos y causaron los síntomas típicos de la enfermedad observada en campo. Similarmente, en otros estudios previos se ha determinado la patogenicidad de aislados de *F. oxysporum* sensu lato en el cultivo de garbanzo, y se observaron

los mismos síntomas a los reportados en el presente estudio (Ali *et al.*, 2002; Arvayo-Ortiz *et al.*, 2012; Guerreo-Aguilar *et al.*, 2015; Ayana *et al.*, 2019; Yadav y Kumar, 2019; Manasa *et al.*, 2020; Mohamed y Mohamed, 2020; Aslam *et al.*, 2021; Dandale *et al.*, 2021). Aunque las pruebas de patogenicidad en plantas de garbanzo mostraron que algunos aislados de *F. languescens* y *N. falciformis* fueron más virulentos en comparación a los aislados de *F. nirenbergiae* y *F. verticillioides*, no se pudo determinar que exista una especie con una mayor virulencia en comparación a las demás.

Referente a *N. falciformis*, las características de la colonia coincidieron con las reportadas por Kamali-Sarvestani *et al.* (2022); además, las características de las fiálides, microconidios, macroconidios y clamidosporas coincidieron con las descritas por Crespo *et al.* (2019). En el caso del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC), diversos estudios a nivel mundial lo mencionan como agente causante de la marchitez en garbanzo (Avila-Miramontes *et al.*, 2015; Ortega-Murrieta *et al.*, 2016; Cabral *et al.*, 2016; Fierros-Leyva *et al.*, 2019; Yogesh y Vandana, 2021). El género *Neocosmospora*, es un género muy diverso que contiene hasta la fecha 86 especies filogenéticamente distintas y muchas de ellas son importantes especies fitopatógenas, incluyendo agentes de la pudrición de fruto, pudrición de raíz y marchitez de plántulas en diferentes hospedantes (Sandoval-Denis y Crous, 2018; Guarnaccia *et al.*, 2019; Sandoval-Denis *et al.*, 2019; Crous *et al.*, 2021). Las especies mayormente reportadas corresponden a *N. falciformis* y *N. solani* (Sandoval-Denis y Crous, 2018). En México, Félix-Velarde *et al.* (2022) recientemente reportaron a *N. falciformis* ocasionando pudrición de raíz en garbanzo, tal como en este estudio. Por otra parte, se ha asociado a *N. falciformis* a la enfermedad de la marchitez en guayaba (*Psidium guajava*) (Gangaraj *et al.*, 2021).

Fusarium nirenbergiae fue descrito por Lombard *et al.* (2019) en clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Países Bajos. Los caracteres morfológicos observados en este estudio concuerdan claramente con los reportados por Aiello *et al.* (2021). Asimismo, los tres aislados de *F. nirenbergiae* fueron patogénicos en plantas de garbanzo y ocasionaron marchitez. De manera similar, también se ha registrado el síntoma de marchitez en plantas de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Italia, en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Brasil, yam (*Dioscorea polystachya*), un árbol tipo maple (*Acer negundo*) y la pudrición del cormo en saffron (*Crocus sativus*) en China inoculadas artificialmente con esta especie (Zhao *et al.*, 2019; Dongzhen *et al.*, 2020; Aiello *et al.*, 2021; De Carvalho *et al.*, 2022; Mirghasempour *et al.*, 2022; Mirghasempour *et al.*, 2022). Hasta el momento; esta es la escasa

información disponible sobre la patogenicidad y rango de hospedantes afectados por *F. nirenbergiae*. Por este motivo, consideramos que este es el primer reporte de *F. nirenbergiae* como agente causal de la marchitez en garbanzo en México y a nivel mundial.

En el presente estudio se identificaron dos aislados de *F. verticillioides*, perteneciente al complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC), dicho complejo es uno de los mejores estudiados y contiene más de 60 especies filogenéticamente distintas reconocidas y distribuidas en diferentes ecologías (Yilmaz *et al.*, 2021). Las características de la colonia de *F. verticillioides* coincidieron a las descritas por Guo *et al.* (2021); mientras que, las mediciones de las fiálides, microconidios y macroconidios son similares a las reportadas por Yilmaz *et al.* (2021). Diversos estudios han registrado *F. verticillioides* causando síntomas de marchitez en ñame, pudrición de raíz en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y marchitez en guayaba (*Psidium guajava*) (Dongzhen *et al.*, 2020; Gai *et al.*, 2021; Gangaraj *et al.*, 2021). Sin embargo, este es el primer reporte de *F. verticillioides* como agente causal de la marchitez en garbanzo en México y a nivel mundial.

4.6. Conclusiones

El presente estudio nos muestra un nuevo panorama dentro de la biodiversidad, taxonomía y patogenicidad de especies de *Fusarium* y *Neocosmospora* causantes de la marchitez del garbanzo en el noroeste de México. Se identificó a *F. languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides* y *Neocosmospora falciformis* con base en análisis filogenéticos usando secuencias de ADN con alineamientos combinados de fragmentos de los genes de *TEF1- α* y *rpb2* complementado con características morfológicas. Este es el primer registro de *F. languescens*, *F. nirenbergiae* y *F. verticillioides* como causantes de la marchitez del garbanzo en México. En la prueba de patogenicidad con los diferentes aislados de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis* en plántulas de garbanzo reveló, que *F. languescens* y *N. falciformis* fueron las especies con mayor grado de virulencia.

4.7. Literatura citada

- Aiello, D., Fiorenza, A., Leonardi, G. R., Vitale, A and Polizzi, G. 2021. *Fusarium nirenbergiae* (*Fusarium oxysporum* Species Complex) causing the wilting of passion fruit in Italy. *Plants* 10(10): 1–7.
- Al-Taae, A. K., Al-Taae, H. H. W and Al-Jobory, S. A. E. 2021. Screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties against *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 22(7 y 8):114–120.
- Ali, M. E. K., Inanaga, S and Sugimoto, Y. 2002. Sources of resistance to *Fusarium* wilt of chickpea in Sudan. *Phytopatologia Mediterranea* 41: 163–169.
- Arvayo-Ortiz, R. M., Esqueda, M., Acedo-Félix, E., Gonzalez-Ríos, H and Vargas-Rosales, G. 2012. New lines of chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* wilt. *American Journal of Applied Sciences* 9(5): 686–693.
- Aslam, M., Shah, J. V., Hussain, N., Ghaffar, A., Abbas, M., Hassan, M. F., Khan, A. A., Nadeem, M and Irshad, M. 2021. Chickpea advanced lines screening for sources of resistance against two major diseases of chickpea “wilt and blight”. *Pakistan Journal of Phytopatology* 33(2): 369–382.
- Ávila-Miramontes, J. A., Padilla-Zaldo, G., Martínez-Heredia, D., Rivas-Santoyo, F. J., Coronado-Espericueta, M. A y Ortega-Murrieta, P. 2015. Respuesta de algunos componentes del rendimiento del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación de *Mesorhizobium ciceri*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la región agrícola de la Costa de Hermosillo. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 17(3): 3–8. doi:10.18633/bt.v17i3.212.
- Ayana, A., Hailu, N and Taye, W. 2019. Screening Desi and Kabuli chickpea varieties against *Fusarium* wilt resistance in West Gojam, Northwestern Ethiopia. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 10(2): 1–6.
- Azevedo, D. M. Q., Rocha, F. S., Costa, C. A., Pfenning, L. H., Da Costa, S. S., Melo, M. P., Da Silva, J. G and Fernanades, M. F. G. 2017. Etiology of root rot and wilt disease of chickpea in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 42:273–283.
- Babariya, V. D and Nath, K. 2021. Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes against Collar Rot Disease Caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of Experimental Agriculture International* 43 (6): 9–18 DOI:10.9734/JEAI/2021/v43i630697
- Cabral, C. S., Melo, M. P., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S and Reis, A. 2016. A root rot of chickpea caused by isolates of the *Fusarium solani* species complex in Brazil. *Plant Disease* 100(10): 2171.
- Crespo, M., Lawrence, D. P., Nouri, M. T., Doll, D. A and Trouillas, F. P. 2019. Characterization of *Fusarium* and *Neocosmospora* species associated with crown rot and stem canker of pistacho rootstocks in California. *Plant Disease* 103(8): 1931–1939.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z and Samson, R. A. 2009. *Fungal Biodiversity*. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Netherlands. 269 p.
- Crous, P.W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K. A., Schroers, H. J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G. H. J., Lamprecht, S. C., Cai, L., Rossman, A. Y., Stadler, M., Summerbell, R. C., Taylor, J. W., Ploch, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N.,

- Frisvad, J. C., Abdel-Azeem, A. M., Abdollahzadeh, J., Abdolrasouli, A., Akulov, A., Alberts, J. F., Araújo, J. P. M., Ariyawansa, H. A., Bakhshi, M., Bendiksby, M., Ben Hadj Amor, A., Bezerra, J. D. P., Boekhout, T., Câmara, M. P. S., Carbia, M., Cardinali, G., Castañeda-Ruíz, R. F., Celis, A., Chaturvedi, V., Collemare, J., Croll, D., Damm, U., Decock, C. A., De Vries, R. P., Ezekiel, C. N., Fan, X. L., Fernández, N. B., Gaya, E., González, C. D., Gramaje, D., Groenewald, J. Z., Grube, M., Guevara-Suarez, M., Gupta, V. K., Guarnaccia, V., Haddaji, A., Hagen, F., Haelewaters, D., Hansen, K., Hashimoto, A., Hernández-Restrepo, M., Houbraken, J., Hubka, V., Hyde, K. D., Iturriaga, T., Jeewon, R., Johnston, P. R., Jurjević, Ž., Karalti, I., Korsten, L., Kuramae, E. E., Kušan, I., Labuda, R., Lawrence, D. P., Lee, H. B., Lechat, C., Li, H. Y., Litovka, Y. A., Maharachchikumbura, S. S. N., Marin-Felix, Y., Matio Kemkuignou, B., Matočec, N., McTaggart, A. R., Mičoch, P., Mugnai, L., Nakashima, C., Nilsson, R. H., Noumeur, S. R., Pavlov, I. N., Peralta, M. P., Philips, A. J. L., Pitt, J. I., Polizzi, G., Quaedvlieg, W., Rajeshkumar, K. C., Restrepo, S., Rhaeim, A., Robert, J., Robert, V., Rodrigues, A. M., Salgado-Salazar, C., Samson, R. A., Santos, A. C. S., Shivas, R. G., Souza-Motta, C. M., Sun, G. Y., Swart, W. J., Szoke, S., Tan, Y. P., Taylor, J. E., Taylor, P. W. J., Tiago, P. V., Váczy, K. Z., van de Wiele, N., van der Merwe, N. A., Verkley, G. J. M., Vieira, W. A. S., Vizzini, A., Weir, B. S., Wijayawardene, N. N., Xia, J. W., Yáñez-Morales, M. J., Yurkov, A., Zamora, J. C., Zare, R., Zhang, C. L. and Thines, M. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98: 1–184.
- Dandale, S., Mane, S. S., Ingle, S. T., Jadhav, P. V., Patil, A. N., Nandanwal, R. S., Jankar, K. B., Tatte, R. R. and Kalane, P. N. 2021. Pathogenic variability among specific isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing chickpea wilt. *The Pharma Innovation Journal* 10(6): 20–28.
- De Carvalho, P. J. F., De Almeida, C. P., Ferrari, B. C. C., Cunha, G. G. M., Júnior, B. C., Harakava, R., Morais, C. S. A., Chiorato, A. F. and Benchimol-Reis, L. 2022. Molecular and pathogenicity characterization of *Fusarium oxysporum* species complex associated with Fusarium wilt of common bean in Brazil. *Tropical Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00502->
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, F. and Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414–430.
- Dhawale, S. N. and Dhale, A. 2021. Effects of *Fusarium* wilt on chickpea in India: A review. *International Journal of Botany Studies* 6(4): 884–890.
- Dongzhen, F., Xilin, L., Xiaorong, C., Wenwu, Y., Yunlu, H., Yi, C., Jia, C., Zhimin, L., Litao, G., Tuhong, W., Xu, J. and Chunsheng, G. 2020. *Fusarium* Species and *Fusarium oxysporum* Species Complex genotypes associated with yam wilt in South-Central China. *Frontiers in Microbiology* 11: 1–17.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Faruk, M. I. and Khatun, F. 2020. Development of eco-friendly management packages against foot and root rot and wilt diseases of chickpea. *International Journal of Agricultural Science Research* 8(1): 001–009.
- Félix-Velarde, S., Valenzuela-Herrera, V., Ortega-Murrieta, P. F., Fierros-Leyva, G. A., Rojas-Rojas, P. A., López-Orona, C. A. and Retes-Manjarrez, J. E. 2022. First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) Causing Root Rot on Chickpea in Mexico. *Plant Disease* 106(1): 329.

- Fierros-Leyva, G. A., Acosta-Gallegos, J. A., Ortega-Murrieta, P. F., Padilla-Valenzuela, I., Álvarez-Bravo, A., Ramírez-Soto, M y Velarde-Félix, S. 2019. Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 10(1): 131–142. doi:10.29312/remexca.v10i1.1730.
- Gai, X. T., Jiang, N. Lu, C. H., Xia, Z. Y and He, Y. S. 2021. First report of Tobacco *Fusarium* root rot caused by *Fusarium verticillioides* in China. *Plant Disease* 105(11): 3762.
- Gangaraj, R., Nagaraja, A., Gaba, S., Das, A., Prameeladevi, T., Debbarma, R., Choudhary, S. P., Kumari, A and Kamil, D. 2021. Occurrence, identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with guava wilt disease in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 55(2): 175–197.
- Guarnaccia, V., Aiello, D., Polizzi, G., Crous, P.W and Sandoval-Denis M. 2019. Soilborne diseases caused by *Fusarium* and *Neocosmospora* spp. on ornamental plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 58(1): 127–137. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-23587
- Guerrero-Aguilar, B. Z., Acosta-Gallegos, J. A., Sánchez-García, B. M., Ortega-Murrieta, P. F y Gonzalez-Chavira, M. M. 2015. Razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo cultivado en Guanajuato, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(2): 183–190.
- Gou, Z., Yu, Z., Li, Q., Tang, L., Guo, T., Huang, S., Mo, J., Hsiang, T and Luo, S. 2021. *Fusarium* species associated with leaf spots of mango in China. *Microbial Pathogenesis* 150: 1–11.
- Hadi, A. M and İnal, B. 2019. Genetic characterization and virulence of *Fusarium* spp. isolated from chickpea. *Cellular and Molecular Biology* 65(1): 56–60.
- Hale, S. M., Patil, M. G and Mali, R. V. 2020. Cultural, morphological and pathogenic variability among the different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9(6): 613–619.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. del M., Landa, B. B and Navas-Cortés, J. A. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop protection* 73(1): 16–27.
- Kamali-Sarvestani, S., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Salmaninezhad, F and Cacciola, S. O. 2022. *Fusarium* and *Neocosmospora* Species Associated with Rot of *Cactaceae* and Other Succulent Plants. *Journal of Fungi* 8, 364: 1–18.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., and Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695-1701. Doi:10.1093/molbev/mss020.
- Laurence, M. H., Summerell, B. A., Burguess, L. W and Liew, E. C. Y. 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology* 118: 374-384.
- Liu, Y. J., Whelen, S and Hall, B. D. 1999. Phylogenetic relationship among ascomycetes: evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808.
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C and Crous, P. W. 2019. Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. *Persoonia* 43(1): 1–47.
- Manasa, B., Priya, M. S., Jayalakhmi, V and Umamaheswari. 2020. Screening of large and extra-large seeded kabuli chickpea genotypes for resistance to *fusarium* wilt under scarce rainfall zone. *International Journal of Chemical Studies* 8(3): 498–500.
- Mirghasempour, S. A., Studholme, D. J., Chen, W., Cui, D and Mao, B. 2022. Identification and characterization of *Fusarium nirenbergiae* associated with saffron corm rot disease. *Plant*

Disease 106(2): 486–495.

- Mirghasempour, S. A., Studholme, D. J., Chen, W., Zhu, W and Mao, B. 2022. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium* Species associated with corm rot disease in saffron from China. *Journal of Fungi* 8(515): 1–13.
- Mohamed, O. E and Mohamed, A. E. 2020. Screening of Chickpea (*Cicer arietinum*) Genotypes to Three Identified Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in Sudan. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 11(8): 1–5.
- O’Donell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 95: 2044–2049.
- Ortega-Murrieta, P. F., Fierros-Leyva, G. A., Padilla-Valenzuela, I., Valenzuela-Herrera, V., Acosta-Gallegos, J. A., Gutierrez-Pérez, E., Velarde-Félix, S and Rodriguez-Cota, F. G. 2016. Blanoro, nueva variedad de garbanzo blanco de grano extra grande para exportación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(1): 209–216.
- Rambaut, A. (2014). FigTree v1.4.2, A Graphical Viewer of Phylogenetic Trees. Available from (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).
- Samiksha, K. M and Kumar, S. 2021. Methods of evaluation and screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for wilt disease tolerance and potential usage of arbuscular mycorrhizal fungi for biocontrol of wilt: A review. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 22 (37 y 38): 73–83.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G and Crous, P. W. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40(1): 1–25.
- Sandoval-Denis, M and Crous, P. W. 2018. Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia* 41: 109–129.
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L and Crous, P. W. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia* 43(1): 90–185.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Panorama Agroalimentario 2021. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021 (consultado diciembre 2021).
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688–2690. doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446.
- Tamura, K., Stecher, G and Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tekeoğlu, M., Özkilinc, H., Tunali, B., Küsmenoğlu, I and Chen, W. 2017. Molecular identification of *Fusarium* spp. causing wilt of chickpea and the first report of *Fusarium redolens* in Turkey. *Mediterranean Agricultural Sciences* 30(1): 27–33.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C. M., Wingfield, B. D and Crous. P. W. 2021. Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia* 46(1): 129–162
- Yadav, S and Kumar, S. 2019. Screening and evaluation of *Cicer arietinum* genotypes against *Fusarium* wilt under sick field and artificial condition. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 21(4): 1068–1075.
- Yogesh, S. A and Vandana, U. W. 2021. *In vitro* mycoparasitism activity of *Trichoderma* spp

- against *Fusarium solani* inciting root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.). World Journal of Pharmaceutical Research 10(9): 449–457.
- Younesi, H., Darvishnia, M., Bazgir, E and Chehri, K. 2021. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Fusarium* spp. associated with chickpea wilt in western Iran. Journal of Plant Protection Research 61(4): 402–413.
- Zhao, X., Li, H., Zhou, L., Chen, F and Chen, F. 2019. Wilt of *Acer negundo* L. caused by *Fusarium nirenbergiae* in China. Journal of Forestry Research 31(5): 2013–2022.
- Zhou, Q., Nana, L., Chang, K-F., Hwang, S-F., Strelkov, S. E., Conner, R. L., McLaren, D. L., Fu, H., Harding, M. W and Turnbull, G. D. 2018. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada. Crop Protection 105: 49–58.
- Zhou, Q., Yang, Y., Wang, Y., Jones, C., Feindel, D., Harding, M and Feng, J. 2021. Phylogenetic, phenotypic and host range characterization of five *Fusarium* species isolated from chickpea in Alberta, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 43(5): 651–657.

**5. RESPUESTA DE GENOTIPOS DE GARBANZO AL COMPLEJO DE HONGOS
CAUSANTES DE LA MARCHITEZ**

Artículo en preparación

Se pretende enviar a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

5.1. Resumen

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la única especie cultivada dentro del género *Cicer* y ocupa el tercer lugar en producción dentro de las leguminosas. Entre las principales limitantes en la producción de este cultivo están la pudrición de raíz y marchitez, causada por un complejo de hongos con origen en el suelo, incluyendo a especies crípticas pertenecientes al complejo *Fusarium oxysporum* (FOSC), *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta enfermedad se debe manejar con la combinación de diferentes estrategias entre las que sobresale el uso de variedades tolerantes. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de 10 genotipos de garbanzo provenientes del programa de mejoramiento del INIFAP, al daño causado por el complejo de hongos fitopatógenos. Plántulas de 15 días de edad de 10 genotipos (BS'92, Blanoro, Combo 743, CUGA2054, HOGA067, CUGA3168, CUGA08-1210, CUGA09-3160, R-12-1509 y R-12-1507) se inocularon mediante inmersión de raíces en una suspensión de fragmentos miceliales de dos aislados (virulencia alta y baja) de cada uno de los hongos *Fusarium languescens*, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*. La evaluación de la severidad de la enfermedad se realizó 30 días después de la inoculación. El experimento completo se realizó dos veces con resultados similares. Los genotipos mostraron mayor susceptibilidad a *S. sclerotiorum* y *S. rolfsii* comparados con *F. languescens* y *M. phaseolina*. Los aislados altamente virulentos provocaron diferencia significativa en la severidad de la enfermedad en los genotipos evaluados. Además, los genotipos se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su susceptibilidad hacia las cuatro especies de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, genotipos, susceptibilidad.

5.2. Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial después del frijol y el chícharo (Vishruta y Nath, 2021) y se siembra en más de 50 países (Sunkad *et al.*, 2019). Es la única especie del género *Cicer* que es cultivable y tiene la capacidad de incrementar la fertilidad del suelo, particularmente en suelo seco por medio de la fijación del nitrógeno atmosférico (Jendoubi *et al.*, 2017). Nutricionalmente, el garbanzo es alto en proteína, fibra dietaria y minerales esenciales, por lo tanto, juega un papel crítico en la lucha para reducir el hambre y la desnutrición en países en desarrollo (Jha *et al.*, 2020; Mwape *et al.*, 2021). Diferentes factores bióticos y abióticos afectan de manera negativa la producción del garbanzo a nivel mundial. Entre las principales limitantes en la producción de este cultivo se encuentra la pudrición de raíces y marchitez causadas por un complejo de hongos con origen en el suelo, incluyendo a *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*, hongos que pueden reducir el rendimiento del cultivo hasta 80% (Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008; Fierros-Leyva *et al.*, 2019; Vishruta y Nath, 2021; Babariya and Nath, 2021). La marchitez causada por *Fusarium* es una de las enfermedades más severas en este cultivo, provocando pérdidas en rendimiento hasta de 100% en condiciones favorables para la infección (Younesi *et al.*, 2021). La enfermedad se ha asociado principalmente a *Fusarium oxysporum*; sin embargo, la evidencia filogenética señala que *Fusarium oxysporum* es un complejo de especies crípticas (Laurence *et al.*, 2014). Cabe resaltar que el género *Fusarium* comprende al menos 300 especies filogenéticamente distintas (Dongzhen *et al.*, 2020). Por otra parte, *M. phaseolina* y *S. rolfsii* están presentes en todo el mundo afectando a más de 500 especies de plantas en más de 100 familias (Márquez *et al.*, 2021; Napte *et al.*, 2021). Entretanto, *S. sclerotiorum* es un hongo necrotrófico con un rango de hospedantes cerca de 600 especies de plantas, y puede causar hasta 100% de pérdidas en garbanzo (Mwape *et al.*, 2021).

El manejo de las pudriciones y marchitez del garbanzo es difícil, ya que no existe una medida de control eficaz y esta se debería hacer a través manejo integrado incluyendo el uso de variedades tolerantes a la enfermedad y con alto rendimiento (Manasa *et al.*, 2020; Mohamed and Mohamed, 2020). Por lo antes señalado, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de 10 genotipos de garbanzo provenientes del programa de mejoramiento del Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), al daño causado por el complejo de hongos fitopatógenos.

5.3. Materiales y métodos

Para la preparación del inoculo, se cultivaron en medio PDA a 25°C durante 10 días, dos aislados fúngicos de *Fusarium languescens* (perteneciente al complejo de especies *F. oxysporum*), *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*. Los aislados de cada especie, previamente fueron caracterizados de acuerdo a su grado de virulencia. En este estudio, uno de los aislados con virulencia alta y el otro con baja virulencia. La suspensión del inoculo se ajustó a una concentración de 1×10^5 fragmentos miceliales mL⁻¹ y se le adicionó Tween 20®. Las raíces de plántulas de los diferentes genotipos de garbanzo de 15 días de edad (BS'92, Blanoro, Combo 743, CUGA 2054, HOGA 067, CUGA 3168, CUGA08-1210, CUGA09-3160, R-12-1509 y R-12-1507), se inocularon por inmersión en la suspensión de fragmentos miceliales durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, las plántulas de los diferentes genotipos se trasplantaron en macetas con sustrato esterilizado y se mantuvieron en un invernadero a temperatura de 15 a 35°C por 30 días. La evaluación de la severidad de la enfermedad se llevó a cabo con una escala visual de 5 categorías, donde 0= planta sana, 1= 1–25%, 2= 26–50%, 3= 51–75%, 4= 76–100%. El experimento constó de un diseño de bloques completos al azar con arreglo en parcelas divididas (4 patógenos \times 10 genotipos) con 12 réplicas. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (versión 9.3). Las variedades se clasificaron mediante el método estadístico de análisis de conglomerados de medias, para lo cual se utilizaron como variables de agrupación los aislados fúngicos y su grado de virulencia.

5.4. Resultados y discusión

Todos los genotipos de garbanzo evaluados mostraron susceptibilidad hacia las cuatro especies de hongos fitopatógenos, y presentaron síntomas de amarillamiento y marchitez. Estos síntomas se han reportado en diversos estudios con inoculaciones artificiales de *Fusarium oxysporum* sensu lato, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum* en el cultivo de garbanzo (Manjunatha y Saifulla, 2018; Lamont y Bennett, 2019; Hale *et al.*, 2020; Babariya y Nath, 2021). Se encontró diferencia significativa entre los genotipos de garbanzo que fueron inoculados con aislados altamente virulentos, y no se observó diferencia significativa entre los genotipos evaluados con aislados de baja virulencia (Cuadro 1). Además, hubo diferencia entre los aislados de alta y baja virulencia de cada una de las especies de hongos inoculados (Cuadros 2 y 3). La diferencia entre los dos niveles de virulencia y entre las especies de hongos evaluados puede deberse a las diferentes toxinas producidas por los fitopatógenos para invadir a su hospedante en las diferentes etapas del cultivo (Rampersad, 2020; Singh *et al.*, 2021).

El desarrollo de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* s. l., en garbanzo puede estar influenciada por la virulencia, densidad de inóculo y condiciones ambientales. Las altas temperaturas son críticas para el desarrollo de la marchitez y la severidad de la enfermedad es mayor a 25 y 30°C que a 15 a 20°C (Chen *et al.*, 2016). Respecto a *M. phaseolina*, este hongo puede causar pérdidas en rendimiento a altas temperaturas (30 – 35°C) y baja humedad en el suelo (<60%) (Sharma *et al.*, 2016; Márquez *et al.*, 2021). Similarmente, la enfermedad causada por *S. rolfsii* es importante en áreas donde la plántula está expuesta a altas temperatura y alta humedad en el suelo (Singh *et al.*, 2022). En el caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, la enfermedad es favorecida por temperaturas <28°C y condiciones de alta humedad (Willbur *et al.*, 2019).

Diversos estudios mencionan la producción de enzimas degradadoras de la pared celular por parte del complejo de hongos asociados a la marchitez del garbanzo. En el caso de *Fusarium* (FOSC), esta producción de enzimas le permite la formación de una masa gelatinosa que bloquea el sistema de transporte de nutrientes y agua de la planta, provocando la decoloración del sistema vascular de la raíz (Sunkad *et al.*, 2019). De manera similar, *M. phaseolina* libera diferentes toxinas y las enzimas anteriormente mencionadas dentro del hospedante, interrumpiendo la defensa de la planta y resultando en células muertas y establecimiento de la enfermedad (Márquez *et al.*, 2021). En el

caso de *S. rolfisii*, este hongo produce ácido oxálico, reaccionando sinérgicamente con enzimas que causan maceración en el tejido de la planta, además, induce la producción de especies reactivas de oxígeno incluyendo el superóxido radical, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, los cuales dañan la membrana y destruyen organelos celulares (Kumari *et al.*, 2020). Mientras que, *S. sclerotiorum* secreta enzimas degradadoras de la pared celular que facilita la penetración, maceración del tejido y degradación de componentes de la pared celular del hospedante (Bolton *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Severidad de la enfermedad causada por aislados de cuatro hongos fitopatógenos con diferente nivel de virulencia en 10 genotipos de garbanzo.

Genotipo	Severidad de la enfermedad	
	Aislados altamente virulentos	Aislados poco virulentos
Blanco Sinaloa 92	3.63 ab*	3.56 a
Blanoro	3.52 b	3.56 a
HOGA067	3.63 ab	3.54 a
Combo 743	3.65 ab	3.42 a
CUGA2054	3.66 ab	3.54 a
CUGA09-3160	3.88 a	3.68 a
CUGA-3168	3.81 a	3.68 a
CUGA08-1210	3.63 ab	3.54 a
R-12-1507	3.65 ab	3.68 a
R-12-1509	3.65 b	3.60 a

*= Medias con una letra común en la misma columna, no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

Cuadro 2. Comparación de medias de severidad de la enfermedad causada por aislados de cuatro hongos fitopatógenos altamente virulentos en 10 genotipos de garbanzo.

Genotipo	Severidad de la enfermedad			
	<i>F. languescens</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. rolfisii</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Blanoro	3.42 abcd*	2.83d	3.83 abc	4.00 a
Blanco Sinaloa'92	3.50 abcd	3.33 abcd	3.75 abc	3.92 ab
Combo 743	3.25 abcd	3.33 abcd	4.00 a	4.00 a
CUGA2054	3.33 abcd	3.50 abcd	4.00 a	3.83 abc
CUGA-3168	3.83 abc	3.58 abcd	3.92 ab	3.92 ab
CUGA09-3160	3.83 abc	3.67 abc	4.00 a	4.00 a
HOGA067	3.42 abcd	3.33 abcd	3.92ab	3.83 abc
CUGA08-1210	3.58 abcd	3.08 cd	3.92 ab	3.92 ab
R-12-1507	3.42 abcd	3.17 bcd	4.00 a	4.00 a

R-12-1509 3.42 abcd 3.17 bcd 4.00 a 4.00 a

*= Medias con una letra común en la misma columna, no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

Cuadro 3. Comparación de medias de severidad de la enfermedad causada por aislados de cuatro hongos fitopatógenos con baja virulencia en 10 genotipos de garbanzo.

Genotipo	Severidad de la enfermedad			
	<i>F. languescens</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Blanoro	3.42ab*	3.00 b	3.83 ab	4.00 a
Blanco Sinaloa'92	3.25 ab	3.75 ab	3.75 ab	3.50 ab
Combo 743	3.08 ab	3.00 b	3.67 ab	3.92 ab
CUGA2054	3.17 ab	3.67 ab	3.50 ab	3.83 ab
CUGA-3168	3.92 ab	3.17 ab	4.00 a	3.67 ab
CUGA09-3160	3.25 ab	3.58 ab	3.92 ab	4.00 a
HOGA067	3.58 ab	3.17 ab	3.67 ab	3.75 ab
CUGA08-1210	3.33 ab	3.50 ab	3.42 ab	3.92 ab
R-12-1507	3.33 ab	3.58 ab	4.00 a	3.83 ab
R-12-1509	3.00 b	3.42 ab	4.00 a	4.00 a

*= Medias con una letra común en la misma columna, no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

De acuerdo a los resultados, el aislado de virulencia alta de *S. rolfsii* ocasionó la mayor severidad de la enfermedad en los genotipos de garbanzo Combo-743, CUGA-2054, CUGA09-3160, R-12-1507 y R-12-1509, lo cual se puede deber a su crecimiento micelial prolífico y habito necrotrófico (Akram *et al.*, 2008; Shirsole *et al.*, 2019). Un comportamiento similar se observó con los aislados de *S. sclerotiorum* hacia los genotipos Blanoro, Combo 743, CUGA09-3160, R-12-1507 y R-12-1509, lo cual se pudo deber a su conocida agresividad y su habilidad para atacar, colonizar y causar daño (Mwape *et al.*, 2021). En caso contrario, el aislado de virulencia alta de *M. phaseolina* ocasionó menor nivel de severidad hacia el genotipo de Blanoro, aunque Sharma *et al.* (2016) mencionan que la variabilidad patogénica de *Macrophomina* se debe a mutaciones, fusión de hifas y recombinación mitótica (Manjunatha y Saifulla, 2018).

Diversos estudios han reportado la producción de esclerocios por parte de *S. rolfsii* (Akram *et al.*, 2008; Kumari y Ghatak, 2018), *S. sclerotiorum* (Bolton *et al.*, 2006) y *M. phaseolina* (Sharma *et al.*, 2016), los cuales son estructuras de resistencia, así como fuente primaria de inóculo para el desarrollo de la enfermedad. Sharma *et al.* (2016) reportaron para *M. phaseolina*, una relación

significativa entre la formación de esclerocios, la densidad y la severidad de la enfermedad. En el caso de *Fusarium oxysporum* s. l., este produce clamidosporas y el suelo infestado por estas estructuras es fuente de inóculo primario para el desarrollo de la marchitez (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Con base en el análisis de conglomerados integrado por genotipos en función de cada especie de hongo fitopatógeno evaluado y su grado de virulencia, se observaron tres grupos, el conglomerado 1 que agrupó 2 genotipos (Blanoro y Combo 743), el conglomerado 2 que agrupó 7 genotipos (BS'92, CUGA-2054, HOGA-067, CUGA08-1210, R-12-1507, R-12-1509 y CUGA09-3160) y el 3 que agrupó solo al genotipo CUGA-3168. En dicho análisis, Blanoro y Combo 743 fueron los genotipos que presentaron menor grado de susceptibilidad a los fitopatógenos, mientras que el genotipo CUGA-3168 mostró el mayor grado de susceptibilidad (Figura 1).

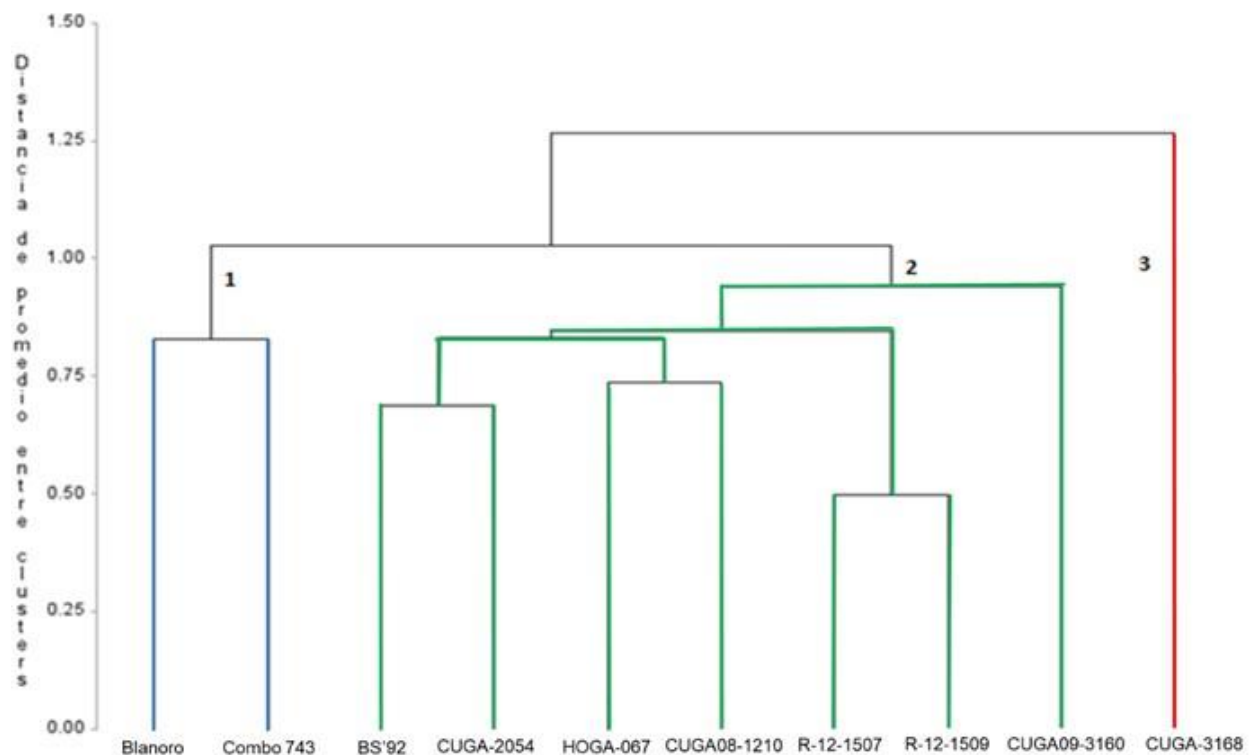


Figura 1. Número de grupos integrados entre variedades en función de las especies de hongos y aislados evaluados.

El manejo de la marchitez causada por *Fusarium* (FOSC) es difícil a pesar de la rotación de cultivos o aplicación de fungicidas debido a la naturaleza del patógeno con origen en el suelo. En *M. phaseolina*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*, ocurre algo similar a la descrito en *Fusarium*, debido a que este grupo de hongos no pueden ser controlados eficazmente mediante el uso de control químico,

físico y cultural debido a su amplio rango de hospedantes y su sobrevivencia en el suelo por largos periodos de tiempo en forma de esclerocios. Por lo cual, el método con mayor efectividad factible y económicamente viable, es el uso de genotipos tolerantes de garbanzo (Kumari and Ghatak, 2018; Patidar *et al.*, 2019; Dandale *et al.*, 2021; Sheshma *et al.*, 2022).

Diversos estudios se han realizado para la búsqueda de fuentes de resistencia a *F. oxysporum* s. l. (Yadav y Kumar, 2019), *M. phaseolina* (Al-Taae *et al.*, 2021), *S. sclerotiorum* (Mwape *et al.*, 2021) y *S. rolfisii* (Vishruta y Nath, 2021) en genotipos de *Cicer* spp., sin embargo, únicamente se han encontrado algunos genotipos de garbanzo con resistencia a *F. oxysporum* s. l. (Yadav y Kumar, 2019). Por lo anterior, se requiere continuar con la búsqueda de fuentes de resistencia a los diversos hongos con origen en el suelo que afectan al cultivo de garbanzo con la finalidad de incluir dicha resistencia a las futuras variedades de garbanzo a desarrollar en México.

5.5. Conclusiones

Los aislados altamente virulentos de *F. languescens*, *M. phaseolina*, *S. rolfisii* y *S. sclerotiorum* ocasionaron mayor grado de severidad de la enfermedad en los diferentes genotipos de garbanzo, respecto al daño causado por los aislados con baja virulencia.

Los aislados de *S. rolfisii* y *S. sclerotiorum* provocaron mayor severidad de la enfermedad en los diferentes genotipos de garbanzo en comparación con los aislados de *F. languescens* y *M. phaseolina*.

Los genotipos Blanoro y Combo 743 fueron los que presentaron menor nivel de susceptibilidad en respuesta a la infección causada por las cuatro especies de hongos fitopatógenos, mientras que, el genotipo CUGA-3168 fue el más susceptible entre los 10 genotipos evaluados.

5.6. Literatura citada

Akram, A., Iqbal, M. S. H., Rauf, A. C. H and Aleem, R. 2008. Detection of resistant sources for collar rot disease in chickpea germplasm. Pakistan Journal of Botany 40(5): 2211–2215.

- Akram, A., Muhammad, I. S. H., Aleem, R. Q and Abdul, C. R. 2008. Variability among isolates of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of chickpea in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40(1): 453–460.
- Al-Taae, A. L., Al-Taae, H. H. W and Al-Jobory, S. A. E. 2021. Screening of chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties against *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 22(8):114–120.
- Babariya, V. D and Nath, K. 2021. Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes against Collar Rot Disease Caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of Experimental Agriculture International* 43(6): 9–18
- Bolton, N. D., Thoma, P. H. J and Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary: Biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7(1): 1–16.
- Chen, W., Sharma, H. C and Muehlbauer, F. J. 2016. Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS Press. The American Phytopathological Society. ISBN: 978-0-89054-383-2. 164 p.
- Dandale, S., Mane, S. S., Ingle, S. T., Jadhav, P. V., Patil, A. N., Nandanwal, R. S., Jankar, K. B., Tatte, R. R and Kalane, P. N. 2021. Pathogenic variability among specific isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing chickpea wilt. *The Pharma Innovation Journal* 10(6): 20–28.
- Dongzhen, F., Xilin, L., Xiaorong, C., Wenwu, Y., Yunlu, H., Yi, C., Jia, C., Zhimin, L., Litao, G., Tuhong, W., Xu, J and Chunsheng, G. 2020. *Fusarium* Species and *Fusarium oxysporum* Species Complex Genotypes Associated With Yam Wilt in South-Central China. *Frontiers in Microbiology* 11: 1964. doi: 10.3389/fmicb.2020.01964.
- Fierros-Leyva, G. A., Acosta-Gallegos, J. A., Ortega-Murrieta, P. F., Padilla-Valenzuela, I., Álvarez-Bravo, A., Ramírez-Soto, M y Velarde-Félix, S. 2019. Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10: 131–142.
- Hale, S. M., Patil, M. G and Mali, R. V. 2020. Cultural, morphological and pathogenic variability among the different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 9(6): 613–619.
- Jendoubi, W., Bouhadida, M., Boukteb, A., Beji, M and Kharrat, M. 2017. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. *Agriculture* 7(23): 1–16.
- Jha, U. C., Saabale, P. R., Manjunatha, L., Chaturvedi, S. K and Singh, N. P. 2020. Advanced chickpea lines resistant against fusarium wilt. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 91(1): 176–178.
- Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M. del M., Landa, B. B and Navas-Cortés, J. A. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop protection* 73(1): 16–27.
- Kumari, A and Ghatak, A. 2018. Variability in Chickpea Rot-causing Soil-borne Necrotrophs, *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Journal of AgriSearch* 5(4): 247–253 <https://doi.org/10.21921/jas.5.4.6>.
- Kumari, A., Ghatak, A and Srinivasaraghavan, A. 2020. Biochemical responses of soil-borne necrotroph *Sclerotium rolfsii* during the pathogenesis on chickpea. *International Journal Of Chemical Studies* 8(1): 2596–2601.
- Lamont, G. E and Bennett, S. J. 2019. Lesion and sclerotia development in four pulse species when inoculated with different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proceedings of the 2019 Agronomy Australia Conference, 25–29 August 2019, Wagga Wagga, Australia.*

- Luarence, M. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W and Liew, E. C. Y. 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology* 118(1): 374–384.
- Manasa, B., Shanthi, M. P., Jayalakshmi, V and Umamaheswari, P. 2020. Screening of large and extra-large seeded kabuli chickpea genotypes for resistance to *Fusarium* wilt under scarce rainfall zone. *International Journal of Chemical Studies* 8(3): 498–500.
- Manjunatha, H and Saifulla, M. 2018. Variation in virulence of *Macrophomina phaseolina* isolates causing dry root rot of chickpea and performance of chickpea genotypes against this disease. *Legume Research* 41(3): 468–473.
- Márquez, N., Giachero, M. L., Declerck, S and Ducasse, D. A. 2021. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science* 12(1): 1–16.
- Mohamed, O. E and Mohamed, A. E. 2020. Screening of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes of three identified races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in Sudan. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 11(507): 1–5.
- Mwape, V. W., Khentry, Y., Newman, T. E., Denton-Giles, M., Derbyshire, M. C., Chen, K., Berger, J and Kamphuis, L. G. 2021. Identification of sources of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in a collection of wild *Cicer* germplasm. *Plant Disease* <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0367-RE>
- Mwape, V., Mobegi, F., Regmi, R., Newman, T., Kamphuis, L and Derbyshire, M. 2021. Analysis of differentially expressed *Sclerotinia Sclerotiorum* genes during the interaction with moderately resistant and highly susceptible chickpea lines. *BMC Genomics* 22(333): 1–14.
- Napte, N. A., Kumbhar, C. T., Khadtare, R. M., Tele, S. B and Hasabnis, S. N. 2021. Effect of different media, light conditions and temperature on growth of *Sclerotium rolfsii* *in vitro*. *The Pharma Innovation* 10(12): 838–841.
- Padilla-Valenzuela, I., Valenzuela-Valenzuela, R. I., Armenta-Castro, C. M., Salinas-Pérez, R. A y Sánchez-Sánchez, E. 2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31:43–49.
- Patidar, J. K., Singh, R., Singh, P. K and Fatehpuria, P. K. 2019. Screening of chickpea lines against dry root rot of chickpea caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(1): 1030–1032.
- Rampersad, S. N. 2020. Pathogenomics and Management of *Fusarium* Diseases in Plants. *Pathogens* 9(340): 1–21.
- Sharma, M., Ghosh, R and Pande, S. 2016. Dry root rot (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler): an emerging disease of chickpea—where do we stand?, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1–16. DOI: 10.1080/03235408.2016.1140564.
- Sheshma, M. K., Kumhar, D. R., Kumar, D., Varma, S and Devi, D. 2022. Screening of chickpea genotypes/varieties against *Sclerotinia* rot of chickpea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary under natural conditions. *The Pharma Innovation Journal* 11(2): 1692–1695.
- Shirsole, S. S., Khare, N., Lakpale, N and Kotasthane, A. S. 2019. Evaluation of fungicides against *Sclerotium rolfsii* Sacc. incitant of collar rot of chickpea. *The Pharma Innovation Journal* 8(12): 310–316.
- Singh, D. S., Tiwari, S and Nathawat, B. D. S. 2021. *Fusarium* wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* management through combination of essential oils and bioagents. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 10(1): 901–904.
- Singh, K., Meena, C. B., Gautam, C and Jewaliya, B. 2022. Symptomatology, isolation and

- pathogenicity test of the collar rot of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) incitant by *Sclerotium rolfsii* (Sacc.). *The Pharma Innovation Journal* 11(3): 23–29.
- Sunkad, G., Deepa, H., Shruthi, T. H and Singh, D. 2019. Chickpea wilt: status, diagnostics and management. *Indian Phytopathology* 72: 619–627.
- Vishruta, D. B and Nath, K. 2021. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes against collar rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Journal of Experimental Agriculture International* 43(6): 9–18.
- Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M and Smith, D. L. 2019. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Tropical Plant Pathology* 44(1): 3–11.
- Yadav, S and Kumar, S. 2019. Screening and evaluation of *Cicer arietinum* genotypes against *Fusarium* wilt under sick field and artificial condition. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences* 21(4): 1068–1075.
- Younesi, H., Darvishnia, M., Bazgir, E and Chechri, K. 2021. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Fusarium* spp. associated with chickpea wilt in western Iran. *Journal of Plant Protection Research* 61(4): 402–413.

6. CONCLUSIONES GENERALES

Actualmente la identificación molecular es parte primordial para el diagnóstico de enfermedades, en el caso de garbanzo (*Cicer arietinum*), su producción es afectada por la enfermedad de la marchitez asociada a un complejo de hongos fitopatógenos con origen en el suelo. En esta investigación, se identificaron molecularmente a nivel de especie a las diferentes especies asociadas a la marchitez del garbanzo, entre ellas: *Fusarium languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides* y *Neocosmospora falciformis* mediante análisis filogenético con alineamientos combinados de fragmentos de ADN de los genes *TEF1- α* y *rpb2*; mientras que, *Clonostachys chloroleuca* se utilizaron *TEF1- α* y la región ITS. En el caso de *Macrophomina phaseolina*, este se identificó mediante iniciadores específicos del fragmento de gen *TEF1- α* . Una vez identificadas las especies, se realizaron las pruebas de patogenicidad y virulencia de cada una de las especies previamente identificadas con diferente número de aislados, mostrando así que todas las especies *F. languescens*, *F. nirenbergiae*, *F. verticillioides*, *N. falciformis*, *C. chloroleuca* y *M. phaseolina* son responsables de causar amarillamiento y marchitez en garbanzo, además, mostraron diferencia en la virulencia. Asimismo, las características morfológicas y culturales de los aislados representativos de *Fusarium* spp. y *Neocosmospora falciformis* indicaron que los aislados obtenidos de tejido de raíz de garbanzo pertenecen a diferentes especies de *Fusarium* y a *Neocosmospora falciformis*, sin embargo, los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción y de las colonias no fueron útiles para discriminar a nivel de especie. Referente a *M. phaseolina*, únicamente en esta especie se realizaron pruebas de compatibilidad micelial, mostrando que todos los aislados de *M. phaseolina* tuvieron la habilidad de fusionar hifas, y se obtuvieron seis grupos de compatibilidad micelial entre los aislados de esta especie obtenidos de lotes de garbanzo de Sinaloa y Sonora. Finalmente, se realizaron evaluaciones de diferentes genotipos de garbanzo contra los diferentes hongos fitopatógenos asociados al complejo de la marchitez. Se determinó que los aislados altamente virulento ocasionaron mayor grado de severidad de la enfermedad comparado con los aislados de baja virulencia. Además, los aislados de *Sclerotium rolfisii* y *Sclerotinia sclerotiorum* provocaron mayor grado de severidad en los diferentes genotipos de garbanzo y se ratificó que todos los genotipos de garbanzo fueron susceptibles contra todos los hongos fitopatógenos asociados al complejo de la marchitez en garbanzo.

7. RECOMENDACIONES

Estos hallazgos tienen implicaciones importantes y se necesitan más estudios sobre el impacto, la epidemiología, la sensibilidad a fungicidas y resistencia a la enfermedad para el desarrollo de estrategias adecuadas para el manejo de la enfermedad en los campos de garbanzo en México.

Se requiere continuar con la búsqueda de fuentes de resistencia a los diversos hongos con origen en el suelo que afectan al cultivo de garbanzo con la finalidad de incluir dicha resistencia a las futuras variedades de garbanzo a desarrollar en México.