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

ETIOLOGÍA DE LA RAÍZ CORCHOSA Y ROSADA EN CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y EVALUACIÓN DE PORTAINJERTOS TOLERANTES A LA ENFERMEDAD EN EL VALLE DE CULIACÁN

Por:

ANA MARÍA LÓPEZ LÓPEZ

TESIS APROBADA POR LA

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

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa. Julio, 2023

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de MC. Ana María López López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Director de Tesis

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Integrante del Comité de Tesis

Dra. Josefina León Félix
Integrante del Comité de Tesis

Dr. Raúl Allende Molar
Integrante del Comité de Tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Etiología de la Raíz Corchosa y Rosada en Cultivos de Tomate *(Solanum lycopersicum* l.) y Evaluación de Portainjertos Tolerantes a la Enfermedad en el Valle de Culiacán" 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 de la autora Ana María López López, 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.

CIAD

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

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A. C.) Coordinación Regional Culiacán, por darme la oportunidad de formar parte de su programa de Doctorado en Ciencias y permitirme desarrollar capacidades y aptitudes profesionales.

A mi director de tesis, Dr. Raymundo García Estrada, porque siempre estuvo pendiente de mí, corrigiendo y orientando en mi formación académica como Doctora en Ciencias, por haber depositado su paciencia y confianza en mí y en este proyecto, por su gran ayuda, agradable amistad y por su sabiduría y consejos. Muchas gracias por todo.

A mi asesor y amigo el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, por su muy apreciada amistad, consejos, sugerencias y gran paciencia, y, sin lugar a dudas, por su gran conocimiento en fitopatología.

A mi asesora la Dra. Josefina León Félix, por su gran disponibilidad, amable colaboración, amistad, siempre llevarme de la mano, su conocimiento en el área de biología molecular y apoyo para poder concluir mi tesis.

A mi asesor el Dr. Raúl Allende Molar, por su gran ayuda, amistad, disponibilidad, consejos, por transmitir su amplia experiencia en la docencia y área fitopatología.

Gracias invaluables a todo el equipo de docencia y técnicos ya sea de investigación y de servicios de este centro de investigación, en especial al Ing. Luis Osuna, que de una u otra forma estuvieron apoyando ya sea con sugerencias, clases, consejos, ayuda, transporte para muestreo, etc.

Así como a mis amigos de laboratorio y de institución con los cuales pudimos apoyarnos y compartir muchas experiencias agradables y de aprendizaje, en especial a MC. Rosalía López. Tu amistad para mi es invaluable y valiosa. Gracias.

Para finalizar, agradezco infinitamente el apoyo, amistad y amor de mi novio MC. Christian Grimaldi, tu apoyo y motivación personal me ayudaron bastante. Gracias por existir.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con todo mi amor, cariño y respeto a mi familia.
*A mi **Papá**, por enseñarme siempre el deber de hacer lo correcto, tu amor para mí es invaluable, por ayudarme a enfrentar con responsabilidad mis errores, dar siempre lo mejor de mí día a día, por toda la paciencia que me has proporcionado, me has dado todo y cada cosa que he necesitado, siempre estaré agradecida. Gracias por ser mi motor.*

*A mi **Mamá**, por siempre motivarme, por educarme, por mostrarme que la vida tiene muchas puertas y no debo aferrarme a salir sólo por una, además de cuidar de mí sin importar obstáculos y tolerar todas las etapas por las que he tenido que pasar en mi vida, sobre todo por su amor incondicional. Cuenta conmigo siempre.*

*A mi **Hermano**, por ser siempre en mi vida un ejemplo de superación, pues él me ha mostrado que no debo de rendirme nunca para lograr lo que quiero, por su complicidad y solidaridad, de nuevo gracias por estar de una u otra forma siempre conmigo. Siempre estaré a tu lado.*

Los amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN……..2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 5
CONTENIDO 6
LISTA DE FIGURAS 7
LISTA DE CUADROS 8
RESUMEN 9
ABSTRACT 11
1. INTRODUCCIÓN 13
1.1. Justificación 13
1.2 Antecedentes 14
1.4. Objetivo General 16
1.5. Objetivos Específicos 16
1.6 Sección Integradora del Trabajo 16
1.7 Referencias 19
2. FIRST REPORT OF *Setophoma terrestris* CAUSING CORKY AND PINK ROOT OF TOMATO IN SINALOA, MÉXICO 22
3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FILOGENIA Y PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *SETOPHOMA TERRESTRIS* CAUSANTES DE RAÍZ CORCHOSA Y ROSADA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN SINALOA, MÉXICO 29
4. HISTOPATOLOGÍA DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Setophoma terrestris* EN RAÍCES DE TOMATE 51
5. RESPUESTA DE PORTAINJERTOS DE TOMATE A LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *Setophoma terrestris* 61
6. CONCLUSIONES GENERALES 72

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Corky root rot caused by *Setophoma terrestris* on tomato…….	27
2	Bayesian tree obtained of combined sequence data of the internal transcribed spacer (ITS) region and large subunit ribosomal RNA (LSU) gene.Bayesian tree obtained of combined sequence data of the internal transcribed spacer (ITS) region and large subunit ribosomal RNA (LSU) gene…….…….....	28
3	Localización de los sitios de recolección de plantas con síntomas de raízcorchosa en agrícolas con producción de jitomate en el valle de Culiacán, Sinaloa….....	34
4	Síntomas de raíz corchosa y rosada en jitomate…….....	40
5	Colonias y estructuras de reproducción asexual de *Setophoma terrrestris*……	42
6	Árbol bayesiano obtenido con datos combinados de secuencias ITS y LSU……	44
7	Pruebas de patogenicidad en plantas de jitomate…….....	45
8	Histopatología de raíces de tomate durante el proceso de infección por *Setophoma terrestres*……	57
9	Portainjertos e híbrido de tomate tolerante a enfermedades con origen en el suelo en invernadero……	66
10	Gráfica de interacción de medias en portainjertos de tomate y aislados de *S. terrestres*……	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Información de los aislados fúngicos y numero de acceso del GenBank de las especies de *Setophoma* usadas en el análisis filogenético……	37
2	Medidas de estructuras asexuales en aislados de *Setophoma terrestris*…….....	41

RESUMEN

El tomate es uno de los principales cultivos de hortalizas en México. En los años 2017 y 2018, se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada con incidencia de 10 al 20% en plantas de tomate en diferentes predios agrícolas del valle de Culiacán. Los síntomas foliares consistieron en clorosis leve en follaje, crecimiento deficiente y senescencia de las hojas. Las raíces con síntomas presentaban lesiones de color café oscuro que se hincharon, se secaron y mostraron una textura corchosa. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente a los aislados fúngicos asociados a los síntomas de raíz corchosa y rosada aislados de cultivos de tomate de diferentes predios agrícolas de Culiacán, Sinaloa, así como verificar su patogenicidad. A partir de las muestras de raíces recolectadas en campo, se obtuvieron nueve aislados monoconidiales. Con base en los caracteres morfológicos, los nueve aislados fúngicos se identificaron como *Setophoma terrestri*s. Para la confirmación de la identificación, se amplificó la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADNr, así como un fragmento del gen 28S del ARNr y los amplicones se secuenciaron. Se realizó un análisis filogenético con el método de inferencia bayesiana, agrupando a los nueve aislados en el clado de *S. terrestris*. La patogenicidad de los aislados se verificó mediante la inoculación de discos miceliales en raíces de 10 plántulas de tomate de un mes de edad. Raíces de plántulas que fueron inoculadas con discos sin micelio, sirvieron como control. Treinta días después de la inoculación, se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada en todas las raíces inoculadas, mientras que las raíces de las plantas de control permanecieron libres de la enfermedad. Posteriormente se evaluaron dos aislados (el más virulento y el menos virulento) en cinco tipos de portainjertos comerciales de tomate tolerantes a la enfermedad: DR0141TX y Multifort (De Ruiter), Top 2010 y 2024 (Ahern) y Aorta (Syngenta®). Así mismo, se evaluó la variedad de tomate susceptible: 8444. Se inocularon 10 plantas por portainjerto y se evaluaron y registraron los datos obtenidos a los 35 días post-inoculación, los cuales se procesaron en el programa Minitab 17, con un diseño de dos factores (inóculos y portainjertos) totalmente al azar, tomando en cuenta la severidad de la enfermedad en estudio. Por último, el proceso de patogénesis del hongo y los síntomas en plantas de tomate se registró mediante técnicas de histopatología. Para ello, se inocularon 50 plantas de tomate, a las cuales posteriormente se les extrajeron las raíces inoculadas, durante un periodo de 0 a 45 días, se realizaron tinciones y cortes en un micrótomo,

para obtener imágenes que evidenciaran el proceso de patogénesis del hongo en la planta.

Palabras clave: *Setophoma terrestris, identificación, patogenicidad, filogenia, histopatología.*

ABSTRACT

Tomato is one of the main vegetable crops in Mexico. In the years 2017 and 2018, corky and pink root symptoms were observed with incidence of 10 to 20% in tomato plants in different farms in the Culiacan valley. Foliar symptoms consisted of mild foliage chlorosis, poor growth, and leaf senescence. Symptomatic roots exhibited dark brown lesions that were swollen, dry, and corky in texture. The objective of this study was to characterize morphologically and molecularly the fungal isolates associated with corky and pink root symptoms that occur in tomato crops from different farms in Culiacan, Sinaloa, as well as verify their pathogenicity. From root samples collected in the field, nine monoconidial isolates were obtained. Based on the morphological characters, the nine fungal isolates were identified as *Setophoma terrestris*. For confirmation of identification, the internal transcribed spacers (ITS) region of the rDNA was amplified, as well as a fragment of the 28S gene of the rRNA, and the amplicons were sequenced. A phylogenetic analysis was performed using the bayesian inference method, grouping the nine isolates into the *S. terrestris* clade D. Pathogenicity of the isolates was verified by inoculating mycelial discs in the roots of 10 one-month-old tomato seedlings. Seedling roots that were inoculated with discs without mycelium served as controls. Thirty days after inoculation, corky and pink root symptoms were observed in all inoculated roots, while the roots of control plants remained free of the disease. Subsequently, two isolates (the most virulent and the least virulent) were evaluated against five types of commercial tomato rootstocks resistant to the disease: DR0141TX and Multifort (De Ruiter), Top 2010 and 2024 (Ahern) and one belonging to Syngenta, as well Likewise, a susceptible tomato variety was evaluated: 8444. Ten plants per rootstock were inoculated and, 35 days post-inoculation, the data were evaluated recorded, and processed in the Minitab 17 program, with a totally random two-factor design (inoculum and rootstocks), taking into account the severity of the disease under study. Finally, pathogenesis of the fungus and the symptoms in tomato plants was registered by using histopathology techniques. For this objective, approximately 50 tomato plants were inoculated, later the inoculated roots were extracted from 0 to 45 days, staining and sections with a microtome were conducted to obtain images to show the pathogenesis process of the fungus in the plant.

Keywords: *Setophoma terrestris*, *identification*, *pathogenicity*, *phylogeny*, *histophatology.*

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

Entre los principales cultivos hortícolas en México se encuentra el tomate; sin embargo, su producción se limita debido a enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos. Una de las principales enfermedades es la raíz corchosa y rosada causada por el hongo *Setophoma terrestris*, el cual también ataca a otros hospedantes; sin embargo, en el valle de Culiacán no existe un estudio con una identificación basada en técnicas morfológicas-moleculares, así como determinación desde patogenicidad, histopatología e índice de severidad en raíces y filogenia de las especies de *S. terrestris* patogénicas en cultivos de tomate, por lo que también se consideró estudiar la respuesta a tolerancia en diferentes portainjertos de tomate como estrategia de control en esta enfermedad.

En la presente investigación se identificaron las siguientes áreas de oportunidad:

- A nivel científico, determinar el agente causal con precisión de la raíz corchosa y rosada en tomate, en la cual no existiían reportes de la enfermedad ni de su agente causal a nivel nacional, además de conocer el ciclo de la enfermedad.
- En el sector económico, con el uso de portainjertos con resistencia o tolerancia a la raíz corchosa del tomate, se reducirán los costos de aplicación de insumos agrícolas para su control.
- A nivel ambiental, debido a que de esta forma, se evitará contaminar el medio ambiente con fumigantes agresivos como medida de control.

En conclusión, se realizó el aislamiento y caracterización morfológica de los aislados fúngicos asociados a raíz corchosa y rosada en tomate en el Valle de Culiacán, así como la determinación de la incidencia y patogenicidad de la enfermedad, por otra parte se identificó mediante análisis filogenético multilocus los aislados asociados a la enfermedad y se describió el proceso de patogénesis del hongo así como los síntomas en plantas de tomate. Finalmente se evaluó la respuesta de portainjertos de tomate a la infección por los aislados fúngicos causantes de raíz corchosa y rosada en tomate. La importancia de caracterizar adecuadamente al hongo reside en la

etiología de la enfermedad, ya que no se encuentraba anteriormente reportado como agente causal de la enfermedad y por ende no podían comenzar con un buen manejo de cultivo ante este proceso de infección, para ello se realizó la histopatología de la enfermedad, dando lugar a etapas destacables del cultivo en donde puede observárse el desarrollo de la infección. Asimismo, se tomó en cuenta la opción de manejo con la evaluación de portainjertos y así llevar un buen desarrollo del cultivo en la medida de lo posible para abordar la tolerancia de raíz corchosa y rosada en las plantas de tomate en el Valle de Culiacán.

1.2 Antecedentes

México ocupa el noveno lugar como productor mundial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En el ciclo agrícola 2018-2019 produjo un total de 938,009 t, siendo Sinaloa, el estado que encabezó la lista de productores a nivel nacional con 605,261 t (SIAP, 2020). Sin embargo, las plagas y enfermedades son los principales problemas que impactan a este cultivo (Jones *et al*. 2016).

Dentro de las enfermedades en tomate, la raíz corchosa es escasamente estudiada a pesar de ser muy problemática; dicha enfermedad desarrolla lesiones de color café y raíces corchosas. En un inicio, la lesión es limitada y posteriormente se extiende progresivamente y rodea las raíces, desarrollando lesiones que van desde algunos milímetros hasta varios centímetros (Blancard et al, 2011). En este contexto, la enfermedad denominada raíz corchosa, es uno de los problemas más graves en los últimos años en predios agrícolas dedicados al cultivo de tomate en México (Martínez-Ruiz *et al*. 2016).

Aunque la enfermedad de raíz corchosa se observa a menudo en cultivos en invernadero, y su distribución se reportó principalmente en Europa (Schneider, 1984), EE. UU. (Campbell *et al.*, 1982), Líbano (Davet, 1973), y Chile (Olavarria, 1991); no hay suficientes estudios relacionados con el agente causal de la enfermedad (USDA, 2017).

De manera general, la raíz corchosa en tomate es asociada a *Pseudopyrenochaeta lycopersici* (sin. *Pyrenochaeta lycopersici*) como su agente causal (Golzar, 2009), sin embargo, en un estudio realizado en México, se demostró con base en datos morfológicos, análisis filogenéticos y pruebas de patogenicidad, que la raíz corchosa en campos de Sinaloa es causada por *Setophoma terrestris*

y que, además, podía causar raíz rosada en el cultivo (López-López *et al.*, 2020).

Según De Gruyter *et al*. (2010), *S. terrestris* y *P. lycopersici* comparten características morfológicas y genéticas muy similares, las cuales se diferenciaron taxonómicamente de acuerdo con análisis filogenéticos con datos de secuencias concatenadas de la región ITS y fragmentos del gen LSU (Valenzuela-López *et al.*, 2018).

Setophoma es un género de hongo que forma picnidios, los cuales son estructuras de reproducción asexual. El picnidio puede tener forma globosa a subglobosa, así como setas (de allí el origen del prefijo del género "seto"), con un cuello ostiolar alrededor. Dentro de los picnidios se encuentran las esporas denominados conidios, que son hialinos, cilíndricos, sin septos y principalmente gutulados (De Gruyter *et al.*, 2010).

Setophoma terrestris se ha estudiado mayormente en el cultivo de cebolla (*Allium cepa*), ya que es su principal hospedante, ocasionando la enfermedad conocida como raíz rosada, la cual es de importancia y alto impacto económico a nivel mundial. Este hongo primero ataca el sistema radical y progresivamente afecta a la planta hasta la muerte (Castillo y Plata, 2010). También se reportó causando daños a otros hospedantes como: canola (*Brassica napus*) en Canadá (Yang *et al.*, 2017), calabacita (*Curcubita maxima*) en EE. UU. (Rivedal *et al.*, 2018), así como plantas de ajo (*Allium sativum*) y de té (*Camellia sinensis*) en China (Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Debido a que existen pocos estudios sobre raíz corchosa y su agente causal, el objetivo de este estudio fue caracterizar mediante morfología y análisis filogenéticos con secuencias ITS y LSU, además de verificar su patogenicidad a los aislados fúngicos asociados a síntomas de raíz corchosa y rosada en campos de tomate de Culiacán, Sinaloa.

1.3. Hipótesis

1. Al menos una especie de *Pseudopyrenochaeta* y *Setophoma* se encuentran presentes en los cultivos de tomate en el Valle de Culiacán.
2. Es posible encontrar del 20-30% de incidencia de corchosis en los campos agrícolas.
3. Al menos uno de los portainjertos comerciales de tomate es considerado como tolerante a la enfermedad causada por los aislados obtenidos.

1.4. Objetivo General

Identificar las especies de hongos causantes de raíz corchosa y rosada, así como evaluar la tolerancia de portainjertos de tomate a estas especies.

1.5. Objetivos Específicos

1. Aislar y caracterizar morfológicamente los aislados fúngicos asociados a raíz corchosa y rosada en tomate en el Valle de Culiacán.
2. Determinar la incidencia de la enfermedad en campos de tomate, así como verificar la patogenicidad de los aislados obtenidos en plántulas de tomate.
3. Identificar mediante análisis filogenético multilocus, los aislados fúngicos asociados a raíz corchosa y rosada en tomate.
4. Describir el proceso de patogénesis del hongo y los síntomas en plantas de tomate.
5. Evaluar la respuesta de portainjertos de tomate a la infección por los aislados fúngicos causantes de raíz corchosa y rosada.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

Este trabajo de investigación se dividió en artículos, los cuales se abordaron de la siguiente manera: **Artículo 1.** Forma parte de los objetivos 1, 2 y 3 de esta investigación, en el cual durante 2017 y 2018, se observaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) con síntomas de raíz corchosa y raíz rosada en campos comerciales en Culiacán, Sinaloa. Por ello, el objetivo de este estudio fue identificar el agente causal de la enfermedad mediante la combinación de técnicas para determinar características morfológicas, analizar secuencias de ADN y pruebas de patogenicidad. A partir de tejidos con síntomas característicos de la enfermedad, se obtuvieron y purificaron aislados fúngicos en medio de cultivo papa-dextrosa-agar y jugo V8-agar. La identificación morfológica de un

aislado representativo se realizó usando descripciones especializadas con base en las características de picnidios, setas y conidios. Posteriormente se extrajo el ADN, se amplificó la región completa ITS y parte del gen 28S, se secuenció y se realizó un análisis filogenético con el criterio de inferencia bayesiana. Mediante identificación morfológica y análisis filogenético se identificó al hongo *Setophoma terrestris*. Finalmente, la patogenicidad del aislado fúngico se verificó en plántulas de tomate de 35 días de edad, las cuales se inocularon en la raíz con discos de agar con micelio de 4 mm. Treinta días después de la inoculación, se observaron síntomas de raíz corchosa y raíz rosada en las plantas inoculadas, mientras que las plantas testigo permanecieron asintomáticas. Este fue el primer reporte de *S. terrestris* como el agente causal de raíz corchosa y rosada en tomate en México (López-López *et al.*, 2020).

Artículo 2. Describe la segunda parte de los objetivos 1, 2 y 3. En este apartado se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada con una incidencia de 10 a 20% en plantas de tomate localizadas en diversos campos comerciales en Culiacán, Sinaloa, México. En el follaje, las plantas afectadas presentaron clorosis generalizada, con crecimiento raquítico y senescencia de las hojas. En las raíces, se desarrollaron lesiones de color café oscuro y con textura corchosa. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente a los aislados fúngicos asociados a los síntomas de raíz corchosa y rosada en campos de tomate de Culiacán, Sinaloa, así como evaluar su patogenicidad. A partir de las muestras de raíces recolectadas en campo, se obtuvieron ocho aislados monoconidiales y se identificaron como *Setophoma terrestris* con base en los caracteres morfológicos. Para la confirmación de la identidad, se amplificó y se secuenció la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADNr, así como un fragmento del gen 28S del ARNr (LSU). Con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético con el método de inferencia bayesiana y se encontró que las secuencias se agruparon con las secuencias ex–tipo de *Setophoma terrestris*. La patogenicidad de los aislados se verificó mediante la inoculación de discos miceliales en raíces de 10 plántulas de tomate de un mes de edad. Las raíces de plántulas que se inocularon con discos de PDA sin micelio, sirvieron como control. Treinta días después de la inoculación, se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada en todas las raíces inoculadas, mientras que las raíces de las plantas de control permanecieron libres de la enfermedad. De acuerdo con la caracterización morfológica, la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad, se confirmó que *Setophoma terrestris* es el agente causal de la raíz corchosa y rosada en campos agrícolas de tomate distribuidos en Culiacán, Sinaloa.

Artículo 3. Corresponde al objetivo número 4, donde se describió el proceso de patogénesis del

hongo y los síntomas en plantas de tomate. Para ello se utilizaron raíces de plantas sanas de tomate de 30 días de edad. Posterirmete se utilizó un aislado representativo de *S. terrestris* de la Colección de Cultivos de Hongos Fitopatógenos del Laboratorio de Fitopatología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo de la Coordinación Culiacán (no. acceso CCLF02) como inóculo. Posteriormente, se colocaron discos de V8A con inóculo de micelio, manipulándose únicamente la raíz principal del sistema radical de la plántula. Al tiempo cero se extrajeron dos plantas tipo control, posteriormente durante los primeros cinco días consecutivos se estuvieron extrayendo cuatro plantas, en donde tres de ellas fueron inoculadas y una no inoculada considerada como control en su propio tiempo. A partir del quinto día, se inició con las extracciones de las raíces inoculadas cada cuatro días posteriores. Después de las extracciones de las raíces, éstas fueron preservadas en frascos de cristal estériles en solución de formaldehido ácido acético (FAA). En seguida, se realizó la inclusión de parafina y con un microtomo, se realizaron cortes transversales, luego se hicieron las tinciones de las secciones obtenidas con safranina al 1 %, en alcohol etílico al 50 %, verde-rápido al 1 % y en etanol al 96 %. Inmediatamente se montaron en resina Entellan (Merck) y se secaron durante 24 h. Las laminillas se observaron en un microscopio óptico para identificar los daños en tejido. Se realizaron 36 observaciones por muestra. Como resultado a las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) el hongo cubrió el 33% de la epidermis de la raíz, a las 48 hpi se extendió en el 75% de la epidermis. Las hifas comienzan a colonizar el parenquima cortical a los 4 días posteriores a la inoculación (dpi), posteriormente el hongo ingresó al cilindro vascular (floema) a los 9 dpi. Alrededor del xilema y floema se inició la formación presuntivamente de almidón, células taníferas o compuestos fenólicos a los 17 dpi. A los doce días después (29 dpi), se observaron las primeras pigmentaciones en ~~de~~ las células vegetales, las cuales mostraron un tono de color rosa a rojo. Por último, a los 33 dpi se observó una obstrucción total del xilema y floema por parte del hongo en estudio, que en conclusión, debido al impedimento de flujo de agua y nutrientes en la planta, esta llega a manifestar más visiblemente sus síntomas y posteriormente su muerte.

Artículo 4. Aborda el objetivo 5 de la tesis, el cual consistió en evaluar la respuesta de los principales portainjertos de tomate utilizados en Sinaloa, para el manejo de la enfermedad causada por *S. terrestris*. Para ello, se inocularon 15 plantulas de cada uno de cinco portainjertos: Aorta (Syngenta®), DR0141TX (De Ruiter®), Multifort (De Ruiter®), TOP 2010 (Top Seeds®) y TOP 2024 (Top Seeds®) con discos miceliales de dos aislados de *S. terrestris* (uno altamente virulento y otro poco virulento), además, de incluir un híbrido de tomate altamente susceptible (8444). La

evaluación de la severidad de la enfermedad en raíces se realizó a los 35 días después de la inoculación mediante la medición de la longitud de las lesiones. Se utilizó el programa Minitab 19 para realizar el análisis estadístico bifactorial. Se determinó que el híbrido 8444, fue el de mayor susceptibilidad. Por otra parte, los portainjertos de tomate Aorta, TOP 2024 y Multifort mostraron mayor tolerancia a la enfermedad, obsevándose lesiones más pequeñas comparadas con las que presentaron los portainjertos DR0141TX y TOP 2010.

Artículo 5. Este capítulo incluye las conclusiones generales del trabajo de investigación. Se reporta a nivel nacional a *Setophoma terrestris* como el agente causal de la raíz corchosa y rosada en tomate. Asimismo, se confirma la presencia de dicho patógeno con base en herramientas morfológicas, moleculares y filogenéticas. También se concluye que este patógeno, se encuentra~~n~~ presente~~s~~ en los principales campos agrícolas en el Valle de Culiacán, Sinaloa con una incidencia del 10 al 15%. Por otra parte, en la descripción del proceso de patogénesis de *S. terrestris* y los síntomas del hongo observados en las plantas de tomate, se reportó que a las 24 h el hongo comenzó a colonizar a la epidermis de la raíz, diseminándose el día 4 y 9 post inoculación, observándose a los 17 ddi (días después de la inoculación), algunas estructuras presuntivamente compuestas fenólicos y coloración rosada en las células de la raíz. Finalmente, se observa el ingreso total del patógeno al xilema y floema a los 33 post inoculación en plántulas de tomate. Por último, en la evaluación de la respuesta de portainjertos de tomate a la infección por los aislados fúngicos causantes de raíz corchosa y rosada se demostró que la variedad de tomate más susceptible en el estudio fue 8444. Por otra parte, los portainjertos de tomate Aorta, TOP 2024 y Multifort mostraron mayor tolerancia a la enfermedad, observándose lesiones más pequeñas comparadas con las presentadas los portainjertos DR0141TX y TOP 2010.

1.7. Referencias

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. y Condresse T. 2011. Enfermedades del tomate: identificar, conocer y controlar. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid – México. ISBN: 978-84-8476-427-4.

Campbell, R., Schweers, V. And Hall, D. 1982. Corky root in California caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and control by soil fumigation. Plant Disease 66: 657-661. Castillo JA y Plata G. 2010. Diagnóstico de raíz rosada utilizano tecnicas convencionales y moleculares. Revista de Agricultura – Año 62, Nº 48.

Davet, P. 1973. Distribution et évolution du complexe parasitaire des racines de tomate dans une région du Liban ou prédomine le *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider et Gerlach. Annual Phytopathology 5: 53-63.

Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2019. Fungal Databases, Syst. Mycol. Microbiol. Lab., ARS, USDA. Retrieved October 10, 2019, from https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/. Google Scholar.

Golzar, H. 2009. Primer informe de *Pyrenochaeta lycopersici* , agente causal de la pudrición de las raíces de tomate corky en Australia. Plant Disease Australasian Notas 4: 126-128.

de Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2010. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. Mycologia. 102, 1066-1081. https://doi.org/10.3852/09-240

Jones JB, Zitter TA, Momol TM and Miller SA. 2016. Compendium of tomato diseases and pests. Second edition. American Press Society. ISBN: 978-0-89054-434-1. Pp. 15-119. https://doi.org/10.1094/9780890544341

Liu, F., Wang, J., Li, H., Wang, W., Cai, L. 2019. *Setophoma* spp. on *Camellia sinensis*. Fungal Systematics and Evolution. 4, 43–57. https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.05

López-López A.M., León-Félix J., Allende-Molar R., Lima N.B., Tovar-Pedraza J.M. and García-Estrada R.S. 2020. First report of *Setophoma terrestris* causing corky and pink root of tomato in Sinaloa, Mexico. Plant Disease. Vol. 104, No. 5. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN .

Martínez-Ruiz FE, Cervantes-Díaz L, Aíl-Catzím CE, Hernández-Montiel LG, Del Toro Sánchez CL y Rueda-Puente EO. 2016. Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum lycopersicu*m L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. European Scientific Journal June 2016 edition vol.12, No.18 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431. DOI: 10.19044/esj.2016.v12n18p232

Olavarria, L. 1991. Caracterización e identificación del agente causal de la enfermedad raíz corchosa en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Taller de licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 59 p.

Rivedal HM, Stone AG and Johnson KB. 2018. First report of *Setophoma terrestris* causing pink root rot of winter squash (*Cucurbita maxima*) in Oregon. Plant disease. 102(12):2661. DOI: 10.1094/pdis-06-18-0921-pdn.

Schneider, R. 1984. The genus Pyrenochaeta De Not. In: Taxonomy of Fungi, part 2. C.V. Subramanian. ed. Amra Press, Madras. pp. 513-524.

SIAP. 2020. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do Fecha de consulta: junio del 2020.

USDA. 2017. Fecha de consulta: mayo del 2017. https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/

Valenzuela-Lopez N, Cano-Lira JF, Guarro J, Sutton DA, Wiederhold N, Crous PW and Stchigel AM. 2018. Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. Studies in mycology 90: 1–69.

Yang Y., Zuzak K., Harding M., Neilson E., Feindel D. and Feng J. 2017. First report of pink root

rot caused by *Setophoma* (*Pyrenochaeta*) *terrestris* on canola. Canadian Journal of Plant Pathology. 39:3, 354-360, DOI: 10.1080/07060661.2017.1355849.

Zhang FB, Zheng HL, Zhang MQ, Yin YS, Cui M and Gao M. 2019.First report of *Setophoma terrestris* causing pink root of garlic in China. Plant Disease. DOI 10.1094/PDIS-03-18-0530-PDN.

2. FIRST REPORT OF *Setophoma terrestris* CAUSING CORKY AND PINK ROOT OF TOMATO IN SINALOA, MÉXICO

A. M. López-López, **J. Léon-Félix,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, 80110, Sinaloa, México; **R. Allende-Molar,** Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México; **N. B. Lima,** Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), CIAP, INTA. Córdoba, C. P. 5119, Argentina, CONICET-UFyMA (Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola), Córdoba, C. P. 5119, Argentina; **J. M. Tovar-Pedraza, R. S. García-Estrada,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, 80110, Sinaloa, México.

Plant Disease

4 de marzo 2020

https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN

APS Publications

First Report of *Setophoma terrestris* Causing Corky and Pink Root of Tomato in Sinaloa, Mexico

M. López-López, J. Léon-Félix, R. Allende-Molar, N. B. Lima, J. M. Tovar-Pedraza, and R. S. García-Estrada

Affiliations

Authors and Affiliations

M. López-López[1]
J. Léon-Félix[1]
R. Allende-Molar[2]
N. B. Lima[3]
J. M. Tovar-Pedraza[4]
R. S. García-Estrada[4 †]

[1]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, 80110, Sinaloa, México

[2]Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México

[3]Instituto de Patología Vegetal (CIAP-INTA), Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola (UFYMA), CONICET, Córdoba, X5020, Argentina

[4]Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Culiacán, Laboratorio de Fitopatología, Culiacán, 80110, Sinaloa, México

Published Online: 4 Mar 2020

Details Figures Literature Cited Relat

Vol. 104, No. 5
May 2020

Subscribe

ISSN: 0191-2917
e-ISSN: 1943-7692

DOWNLOAD

Caption

Symptoms observed in the field on zucchini plants caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (A. Pérez-Hernández et al.). Photo credit: J. M. Gómez-Vázquez. Peach tree with excavated

https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN

root collar (S. B. Miller et al.). Photo credit: G. Schnabel.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important vegetable crop in Mexico. During 2017 and 2018, symptoms of corky and pink root were observed on ~10 to 20% of tomato plants in commercial fields distributed in Culiacán, Sinaloa, Mexico. Foliar symptoms were slight chlorosis, poor growth, and senescence of leaves. Symptomatic roots exhibited dark brown lesions that became swollen, dried, and corky in texture. Pieces from symptomatic roots were surface disinfested by immersion in a 2% sodium hypochlorite solution for 2 min, rinsed in sterile distilled water, and placed in Petri plates containing V8 juice agar (V8A) and acidified potato dextrose agar (APDA). The plates were incubated at 28°C for 7 days under a 12-h photoperiod. A fungus was consistently isolated, and nine monoconidial isolates were obtained. A representative isolate was selected for morphological characterization, multilocus phylogenetic analysis, and pathogenicity tests. The isolate was deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi at the Research Center for Food and Development (accession no. CCLF01). Colonies cultured on V8A at 25°C for 7 days showed moderate and pink aerial mycelium. On APDA, colonies exhibited sparse and light pink aerial mycelium, with an undulate margin. Microscopic examination showed pycnidial conidiomata (n = 20) covered by setae, globose to subglobose, dark brown, measuring 237 to 345 × 105 to 250 µm. Conidiogenous cells were hyaline and monophialidic. Conidia (n = 100) were aseptate, ellipsoidal to subcylindrical, hyaline, guttulate, measuring 5 to 7 × 2 to 3 µm. Based on morphological characters, the fungus was identified as *Setophoma terrestris* (de Gruyter et al. 2010). To confirm the

morphological identification, genomic DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide method (Doyle and Doyle 1990), and the internal transcribed spacer (ITS) region and part of the 28S gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. The ITS region of rDNA was amplified using the primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990). For amplification of the 28S rRNA partial gene, a nested PCR was performed using the primer sets PM3 (Takamatsu and Kano 2001)/TW14 (Mori et al. 2000) and NL1/TW14 (Mori et al. 2000) for the first and second reactions, respectively. The ITS and 28S sequences were deposited in GenBank under accession numbers MN596166 and MN596167, respectively. A phylogenetic analysis based on Bayesian inference and including the published ITS and 28S dataset for *Setophoma* species was performed. The analysis resulted in a well-supported clade (posterior probability = 1) grouped with the type species of *S. terrestris*. Pathogenicity of the fungus was verified by inoculation of colonized PDA plugs (4-mm diameter) on the wounded root surface of 10 tomato plants of cultivar Enpower (30 days old). PDA plugs without mycelia were used for 10 control plants. All plants were kept under greenhouse conditions at 25 to 35°C and regularly watered. Symptoms of corky and pink root were observed on all inoculated roots after 30 days, whereas roots from control plants remained healthy. Koch's postulates were fulfilled when the fungus was reisolated from the diseased roots and not from control plants. Previously, tomato had been reported as a host of *S. terrestris* (Koike et al. 2007). This fungus was previously known to occur on tomato in Brazil, Canada, the United States, and Venezuela (Farr and Rossman 2019). To our knowledge, this is the first report of *S. terrestris* causing corky and pink root of

tomato in Mexico.

The author(s) declare no conflict of interest.

Funding: This research was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), project INFRA–2019–302117.

APS Publications

The American Phytopathological Society (APS)

3285 Northwood Circle, Suite 100, St. Paul, MN 55121 USA

+1.651.454.7250

FAX +1.651.454.0766

APS

© 2023 The American Phytopathological Society. Powered by Atypon® Literatum.

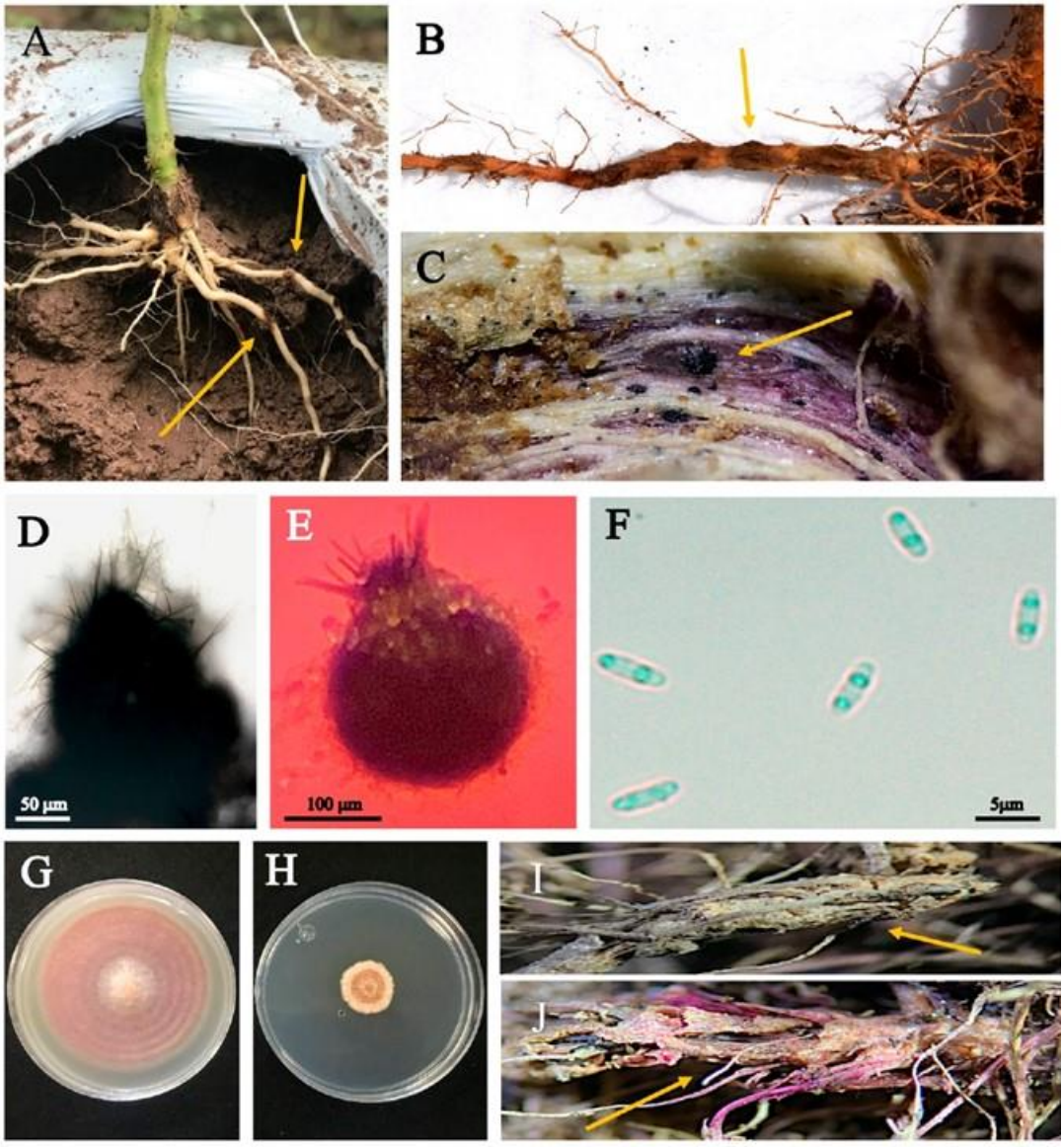


Figure S1. Corky root rot caused by *Setophoma terrestris* on tomato. A) Symptom of corky root rot on naturally infected tomato, **B)** Close-up of corky root symptoms, **C)** Semi immersed pycnidia on pink root of tomato, **D,** Pycnidium produced on naturally infected roots. **E)** Pycnidium produced on V8-Agar medium, **F)** Biguttulate conidia, **G)** Colony morphology after 7 days on V8-Agar medium, **I)** Colony morphology after 7 days on acidified potato dextrose agar medium, **I)** Corky and **J)** pink rot on artificially infected roots

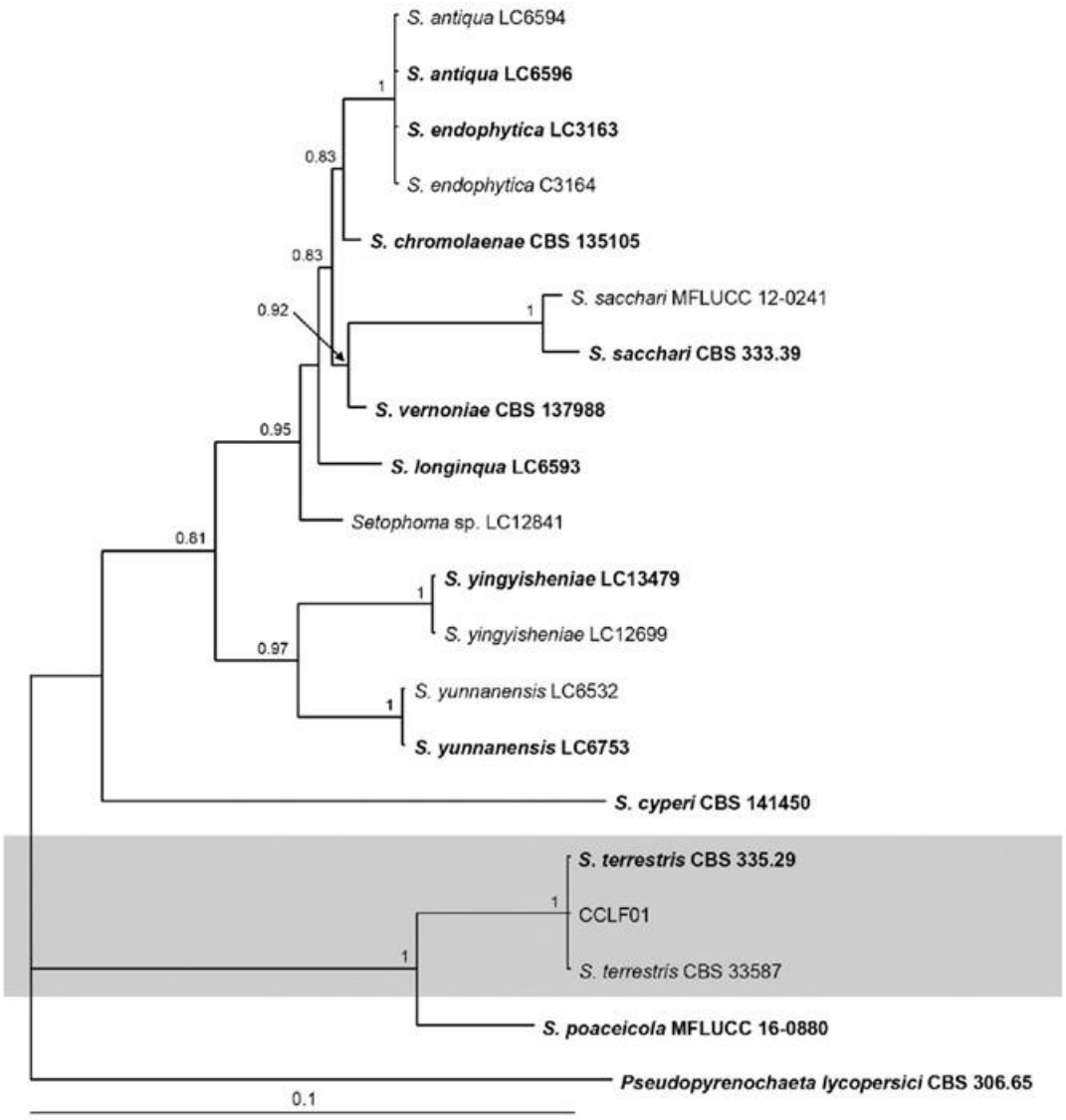


Figure S2. Bayesian tree obtained of combined sequence data of the internal transcribed spacer (ITS) region and large subunit ribosomal RNA (LSU) gene. The tree shows the phylogenetic relationships of *Setophoma* species. Bayesian posterior probability values above 0.80 are shown at the nodes. *Pseudopyrenochaeta lycopersici* is used as outgroup. The scale bar indicates the number of expected changes per site.

4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FILOGENIA Y PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE *SETOPHOMA TERRESTRIS* CAUSANTES DE RAÍZ CORCHOSA Y ROSADA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN SINALOA, MÉXICO

A. M. López-López, **J. M. Tovar-Pedraza, J. León-Félix,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México; **R. Allende-Molar,** Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México; **N. B. Lima,** Universidad Nacional de Catamarca, Departamento de Ingeniería Agronómica, 4700, Catamarca, Argentina; **I. Márquez-Zequera, R. S. García-Estrada,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México.

Revista mexicana de fitopatología

Enviado el: 12 de septiembre del 2022

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA
MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY
Fully Bilingual

Revista Mexicana de Fitopatología
Órgano Internacional de Comunicación
de la Sociedad Mexicana de Fitopatología

12 de septiembre de 2022

Dr. Raymundo Saúl García-Estrada
PRESENTE

Me es grato informarle que hemos recibido el documento electrónico titulado **"Morphological characterization, phylogeny and pathogenesis of isolates of *Setophoma terrestris* causing corky and pink roots of tomato (*Solanum lycopersicum*) in Sinaloa, México"**, mismo que será sometido a un proceso anónimo por pares de revisión científica y editorial coordinado por la Revista Mexicana de Fitopatología (RMF) para su posible publicación.

Se le asignó la clave: **RMF/2209-2**, con la cual haremos referencia durante el proceso de revisión y será usted el canal de comunicación en su carácter de autor de correspondencia.

Le agradezco la confianza en la RMF, órgano de difusión de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, para la publicación de sus actividades de investigación.

Reciba un atento y cordial saludo,

Atentamente,

Dr. Gustavo Mora Aguilera
Editor en Jefe
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

Revista Mexicana de Fitopatología editada por la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Col. Montecillo, Mpio. Texcoco, Edo de México, C.P. 56230. Tel. (01) 595 952 0200 ext. 1620, revmexfitopatologia@gmail.com. Sitio web oficial: http://mf.smf.org.mx/, Versión OJS: http://www.rmf.smf.org.mx/ojs/index.php

Caracterización morfológica, filogenia y patogenicidad de aislados de *Setophoma terrestris* causantes de raíz corchosa y rosada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Sinaloa, México

Morphological characterization, phylogeny and pathogenesis of isolates of *Setophoma terrestris* causing corky and pink roots of tomato (Solanum lycopersicum L.) in Sinaloa, México

Ana María López-López, **Juan Manuel Tovar-Pedraza, Josefina León-Félix,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México; **Raúl Allende-Molar,** Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México; **Nelson Bernardi Lima,** Universidad Nacional de Catamarca, Departamento de Ingeniería Agronómica, 4700, Catamarca, Argentina; **Isidro Márquez-Zequera, Raymundo Saúl García-Estrada,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México. Correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los principales cultivos en México. En los años 2017 y 2018, se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada con una incidencia de 10 a 20% en plantas de tomate localizadas en diversos campos comerciales en Culiacán, Sinaloa, México. En el follaje, las plantas afectadas presentaron clorosis generalizada, con crecimiento raquítico y senescencia de las hojas. En las raíces, se desarrollaron lesiones de color café oscuro y con textura corchosa. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente a los aislados fúngicos asociados a los síntomas de raíz corchosa y rosada en campos de tomate de Culiacán, Sinaloa, así como evaluar su patogenicidad. A partir de las muestras de raíces recolectadas en campo, se obtuvieron ocho aislados monoconidiales y se identificaron como *Setophoma terrestris* con base en los caracteres morfológicos. Para la confirmación de la identidad, se amplificó y se secuenció la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADNr, así como un fragmento del gen 28S del ARNr (LSU). Con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético con el método de Inferencia Bayesiana y se encontró que las secuencias se agruparon con las secuencias ex–tipo de *Setophoma terrestris*. La patogenicidad de los aislados se verificó

mediante la inoculación de discos miceliales en raíces de 10 plántulas de tomate de un mes de edad. Las raíces de plántulas que se inocularon con discos de PDA sin micelio, sirvieron como control. Treinta días después de la inoculación se observaron síntomas de raíz corchosa y rosada en todas las raíces inoculadas, mientras que las raíces de las plantas de control permanecieron libres de la enfermedad. De acuerdo con la caracterización morfológica, la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad, se confirmó que *Setophoma terrestris* es el agente causal de la raíz corchosa y rosada en campos agrícolas de tomate distribuidos en Culiacán, Sinaloa.
Palabras clave: *Setophoma,* hongo, tomate, inferencia bayesiana, enfermedad radical.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el noveno lugar como productor mundial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En el ciclo agrícola 2018-2019 produjo un total de 938,009 t, siendo Sinaloa, el estado que encabezó la lista de productores a nivel nacional con 605,261 t (SIAP, 2020). Sin embargo, las plagas y enfermedades son los principales problemas que impactan a este cultivo (Jones *et al*. 2016).

Dentro de las enfermedades en tomate, la raíz corchosa es escasamente estudiada a pesar de ser muy problemática; dicha enfermedad desarrolla lesiones de color café y raíces corchosas. En un inicio, la lesión es limitada y posteriormente se extiende progresivamente y rodea las raíces, desarrollando lesiones que van desde algunos milímetros hasta varios centímetros (Blancard, 2011). En este contexto, la enfermedad denominada raíz corchosa, es uno de los problemas más graves en los últimos años en predios agrícolas dedicados al cultivo de tomate en México (Pardo, 1999; Martínez-Ruiz *et al*. 2016).

Aunque la enfermedad de raíz corchosa se observa a menudo en cultivos en invernadero, y su distribución se reportó principalmente en Europa (Schneider, 1984), EE. UU. (Campbell *et al.,* 1982), Líbano (Davet, 1973), y Chile (Olavarria, 1991); no hay suficientes estudios relacionados con el agente causal de la enfermedad (USDA, 2017).

De manera general, la raíz corchosa en tomate es asociada a *Pseudopyrenochaeta lycopersici* (sin. *Pyrenochaeta lycopersici*) como su agente causal (Golzar, 2009), sin embargo, en un estudio realizado en México, se demostró con base en datos morfológicos, análisis filogenéticos y pruebas de patogenicidad, que la raíz corchosa en campos de Sinaloa es

causada por *Setophoma terrestris* y que, además, podía causar raíz rosada en el cultivo (López-López *et al*., 2020).

Según De Gruyter *et al*. (2010), *S. terrestris* y *P. lycopersici* comparten características morfológicas y genéticas muy similares, las cuales se diferenciaron taxonómicamente de acuerdo con análisis filogenéticos con datos de secuencias concatenadas de la región ITS y fragmentos del gen LSU (Valenzuela-López *et al*., 2018).

Setophoma es un género de hongo que forma picnidios, los cuales son estructuras de reproducción asexual. El picnidio puede tener forma globosa a subglobosa, así como setas (de allí el origen del prefijo del género "seto"), con un cuello ostiolar alrededor. Dentro de los picnidios se encuentran las esporas denominados conidios, que son hialinos, cilíndricos, aseptados y principalmente gutulados (De Gruyter *et al*., 2010).

Setophoma terrestris se ha estudiado mayormente en el cultivo de cebolla (*Allium cepa*), ya que es su principal hospedante, ocasionando la enfermedad conocida como raíz rosada, la cual es de importancia y alto impacto económico a nivel mundial. Este hongo primero ataca el sistema radical y progresivamente afecta a la planta hasta la muerte (Castillo y Plata, 2010). También se reportó causando daños a otros hospedantes como: canola (*Brassica napus*) en Canadá (Yang *et al*., 2017), calabacita (*Curcubita maxima*) en EE. UU. (Rivedal *et al*., 2018), así como plantas de ajo (*Allium sativum*) y de té (*Camellia sinensis*) en China (Liu *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2019).

Debido a que existen pocos estudios sobre raíz corchosa y su agente causal, el objetivo de este estudio fue caracterizar mediante morfología y análisis filogenéticos con secuencias ITS y LSU de los aislados fúngicos asociados a los síntomas de raíz corchosa y rosada en campos de tomate de Culiacán, Sinaloa, además de verificar su patogenicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras se recolectaron en cinco sitios con producción intensiva de tomate en Culiacán, Sinaloa, México. Estos sitios tenían antecedentes de la presencia de raíz corchosa en tomate. En algunas plantas de tomate en etapa de cosecha, se observaron diferentes tipos de síntomas en el área foliar; entre ellos: clorosis y reducción del crecimiento. Posteriormente, se verificó si las raíces de las plantas mostraban síntomas de la enfermedad, mediante la extracción de

sus raíces y observación de daños a lo largo de las mismas. Una vez confirmados los síntomas relacionados a la enfermedad en el cultivo, se recolectaron 15 muestras de raíces de tomate enfermas por cada sitio (Figura 1). Finalmente, se colocaron en bolsas de plástico y se

trasladaron a las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología, de la Coordinación Culiacán del CIAD.

Figura 1. Localización de los sitios de recolección de plantas con síntomas de raíz corchosa en agrícolas con producción de tomate en el valle de Culiacán, Sinaloa.

Aislamiento, purificación y conservación de hongos

A partir de las lesiones necróticas desarrolladas en las raíces de tomate, se cortaron fragmentos de 5 mm de longitud, se colocaron en placas Petri con medios de cultivo papa dextrosa agar acidificado (APDA) y jugo V8 agar acidificado (V8A), y se incubaron a 25ºC en oscuridad continua. Posteriormente, se realizó la transferencia de los aislados fúngicos a nuevas placas Petri con V8A y después de 10 días en incubación a 25ºC, se purificaron los aislados mediante la técnica de cultivos monospóricos (Crous *et al*., 2019). El cuál consistió en colocar los picnidios sobre portaobjetos y los conidios se observaron bajo el microscopio compuesto, a partir de estos conidios, se obtuvieron cultivos monospóricos en placas Petri con medio V8A y a los 7 días después de la siembra se observó el crecimiento de micelio color rosa. La conservación de los aislados fúngicos se realizó colocando discos de 4 mm de

diámetro a partir de colonias con cinco días de crecimiento y se preservaron a temperatura ambiente en tubos estériles de 2 mL conteniendo agua destilada estéril.

Caracterización morfológica

Con la finalidad de estimular la producción de estructuras asexuales, se colocaron algunas raíces en cámaras húmedas a temperatura de 20ºC. A los 30 días, se retiraron y se observaron en el microscopio estereoscópico, localizando los picnidios y colocándolos en portaobjetos con agua destilada estéril para su observación y caracterización.

La caracterización morfológica de los aislados se realizó usando las claves y descripciones reportadas por De Gruyter *et al.* (2010). Para lo cual, se cultivó el hongo en placas Petri con medio V8A por un periodo de 10 días. Los aislados que no formaron picnidios en el medio V8A, se estimularon mediante el método descrito por Clerjeau (1973), el cual consiste en colocar raíces de plántulas de melón sobre el micelio del hongo de interés con 5–7 días de crecimiento y posteriormente incubar nuevamente a temperatura ambiente (25–30ºC) por 15 a 20 días para la producción artificial de picnidios. Una vez que estos se obtuvieron, se examinaron las características de los picnidios, conidios y setas en un microscopio compuesto (Zeiss®, Alemania) con cámara digital integrada (AxioCam) y se realizaron 50 mediciones de cada una de las diferentes estructuras fúngicas asexuales.

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

La extracción de ADN total se realizó a partir de colonias fúngicas de siete días de edad, cultivadas en medio V8A. 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 microcentrífuga de 1.5 mL con 500 µL de solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CTAB (Tris 100 mM, pH 8; 20 mM de EDTA, pH 8; NaCl, 1.4 M y 3 % de 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 pasó por vórtex por 10 s y se colocó en una centrífuga 5810 R (Eppendorf®, EE. UU.) a 13000 g durante 10 min. Después, el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 700 µL de isopropanol. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se dejaron a -20 °C durante 10 min, luego se centrifugó a 13000 g durante 10 min para precipitar el ADN. Posteriormente, se realizaron dos lavados del precipitado con 500 µL de etanol al 70 %,

centrifugando a 13000 g por 5 min y desechando el sobrenadante en cada vez. Enseguida, se dejó secar la pastilla de ADN colocando los tubos invertidos sobre papel secante por no más de 15 min para permitir la evaporación del etanol y finalmente, se resuspendió el ADN en 100 µL de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y concentración del ADN se evaluó en un espectrofotómetro Q 3000 UV (Quawell, EE. UU.) y electroforesis en geles de agarosa al 1%, considerando adecuado el ADN con valores de pureza (relación de A260/280) entre 1.8 y 2.0 y concentración (A260) de aproximadamente 2.0 µg/µL, así como bandas íntegras de alto peso molecular, respectivamente. El DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

La amplificación de la región ITS del DNAr y la subunidad larga (LSU) se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final. La región ITS (ITS1–5.8S–IT2) se amplificó usando los iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al*., 1990), mientras que la amplificación del gen LSU (incluyendo los dominios D1 y D2) se realizó mediante una PCR anidada usando los iniciadores PM3 (Takamatsu y Kano, 2001)/TW14 (Mori *et al*., 2000) y NL1/TW14 (Mori *et al*., 2000) para la primera y segunda reacción, respectivamente. La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 µL, conteniendo amortiguador de PCR 1X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de dNTPs, 1 µM de cada iniciador, 1U de ADN polimerasa (Promega®, EE. UU.) y 100 ng de ADN. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones de termociclado (termociclador C-1000, Bio-Rad®, EE.UU.): desnaturalización inicial de 95 ºC por 5 min, 35 ciclos de 95 ºC por 30 s, 54 ºC por 30 s, 72 ºC por 30 s, con una extensión final de 72 ºC por 10 min. Para la amplificación del gen 28S se usó las mismas condiciones de termociclado excepto por la temperatura de alineamiento, la cual fue de 52 ºC. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, tomando 5 µL de producto de PCR mezclado con 3 µL de amortiguador de carga. La electroforesis se realizó en amortiguador TAE 1X a 90 V por aprox, 40 min y los resultados se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador M-26X en un sistema de imágenes GelDoc-ItTM 300 (UVP®, EE. UU.). El ADN se purificó mediante el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research®, EE. UU), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y los amplicones purificados se secuenciaron en la empresa Macrogen (www.macrogen.com) en Seúl, Corea del Sur.

Análisis filogenético

La calidad de las secuencias de nucleótidos y el método de ensamblaje se realizaron utilizando el Paquete Staden (Staden *et al.,* 1998). Las secuencias generadas a partir de la región del ITS y la subunidad grande (LSU) del ARNr se alinearon con secuencias de diferentes especies del género *Setophoma* obtenidas del GenBank y a partir de datos de referencia publicados (De Gruyter *et al.,* 2010; Liu *et al.,* 2019) (Cuadro 1). Se generaron alineamientos múltiples de secuencias utilizando ClustalW tal como se implementó en MEGA 11 (Tamura *et al*., 2021) y se mejoraron manualmente para permitir la máxima similitud entre el conjunto de datos. Las estimaciones filogenéticas bayesianas se infirieron con MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al*., 2012) implementado en el clúster CIPRES (https://www.phylo.org/portal2/home.action) y seleccionando el modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajustó a nuestros datos, de acuerdo con el criterio de información de Akaike (AIC) obtenido con MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). El número de generaciones fue de 10.000.000 y las probabilidades posteriores se calcularon después de descartar el primer 25% de las iteraciones. Los árboles filogenéticos se visualizaron con TreeView (Page, 1996).

Cuadro 1. Información de los aislados fúngicos y números de acceso del GenBank de las especies de *Setophoma* usadas en el análisis filogenético.

Taxon	**Código de colección**	**Hospedante**	**País**	**No. de acceso**	
				LSU	**ITS**
Setophoma antiqua	LC6594	*Camellia sinensis*	China	MK511947	MK511909
	LC6595	*Camellia sinensis*	China	MK511948	MK511910
S. chromolaenae	CBS 135105*	*Chromolaena odorata*	Brasil	KF251747	KF251244
S. cyperi	CBS 141450*	*Cyperus sphaerocephala*	Sudáfrica	KX228337	KX228286
S. endophytica	CGMCC 3.19528	*Camellia sinensis*	China	MK511956	MK511931
	LC3164	*Camellia sinensis*	China	MK511957	MK511932
S. longinqua	LC6593*	*Camellia sinensis*	China	MK511946	MK511908
S. poaceicola	MFLUCC 16-0880*		Tailandia	KY550386	KY568988

Setophoma sp.	CGMCC 3.19526	Carbonatita en cueva	China	MK511965	MK511944
S. sacchari	MFLUCC 12-0241	*Saccharum officinarum*	Tailandia	KJ476147	KJ476145
	CBS 333.39*		Brasil	MH867535	MH856038
S. terrestris	LC6449*	*Allium sativum*	EE.UU.	KF251749	KF251246
	CBS 335.87	*Allium cepa*	Senegal	KF251750	KF251247
S. terrestris	CCLF01	*Solanum lycopersicum*	México	MN596167	MN596166
S. terrestris	CCLF02	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960402**	**OL960206**
S. terrestris	CCLF03	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960403**	**OL960207**
S. terrestris	CCLF04	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960404**	**OL960208**
S. terrestris	CCLF05	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960398**	**OL960202**
S. terrestris	CCLF06	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960399**	**OL960203**
S. terrestris	CCLF07	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960400**	**OL960204**
S. terrestris	CCLF08	*Solanum lycopersicum*	México	**OL960401**	**OL960205**
S. vernoniae	CBS 137988*	*Vernonanthura* sp.	Brasil	KJ869198	KJ869141
S. yingyisheniae	LC12699	*Camellia sinensis*	China	MK511951	MK511915
	LC13479*	*Camellia sinensis*	China	MT523031	MK511918
S. yunnanensis	LC6532	*Camellia sinensis*	China	MK511945	MK511907
	LC6753*	*Camellia sinensis*	China	MK511949	MK511913

*aislados ex–tipo. Los números de acceso de las secuencias generadas en este estudio se destacan en negrita. CBS: Colección de aislados en Centraal bureauvoor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos; IMI: Colección de aislados de CABI Europe UK Centre, Egham, Reino Unido; CPC: Colección de trabajo de Pedro W. Crous, alojada en CBS. CGMCC: Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China, Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias de China, Beijing, China; LC: Colección de trabajo de Lei Cai, alojada en el Instituto de Microbiología, Academia China de Ciencias, Beijing, China; MUCL: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica.

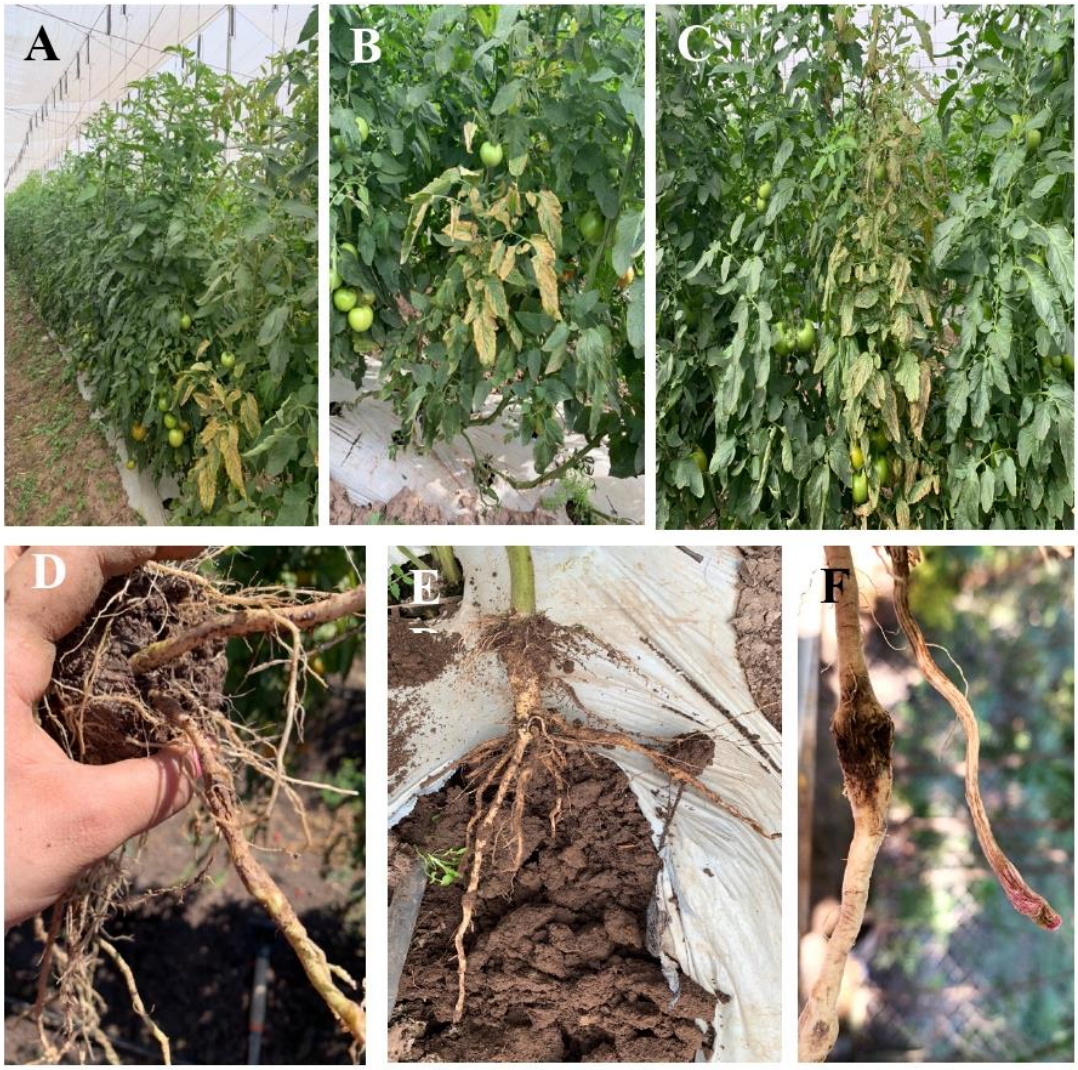
Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de los ocho aislados fúngicos se determinó mediante la inoculación en la raíz principal de plántulas de tomate cv. 8444 de 30 días de edad. Se utilizaron 10 plantas inoculadas con cada uno de los aislados de *S. terrestris*, además de 10 plantas no inoculadas que se sirvieron como control. Se utilizaron discos de V8A de 4 mm de diámetro con crecimiento activo del hongo, los cuales se colocaron sobre una herida previamente realizada con un palillo de madera (mondadiente). El disco micelial se sujetó a la herida de la raíz usando papel Parafilm® (EE. UU.). En las plantas testigo, se realizó la herida y se colocó un disco con medio de cultivo V8A sin crecimiento fúngico. Las plantas se mantuvieron en un invernadero a temperatura de 20–35°C durante 30 días. Posteriormente se extrajeron las raíces inoculadas y se reaisló al patógeno en medio V8A. Una vez desarrollado el micelio, se consideraron las características morfológicas y culturales como son pigmentación del medio V8A, así como los caracteres cualitativos y cuantitativos de setas, picnidios y conidios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo

Se observaron síntomas de clorosis y senescencia de hojas, así como reducción del crecimiento de plantas de tomate (Figuras 2A–C) en una incidencia que varió de 10 a 20% en los cinco diferentes campos agrícolas comerciales muestreados en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. Las raíces sintomáticas desarrollaron lesiones de color café oscuro, hinchadas y con textura corchosa (Figura 2D–E) y rosada (Figura 2F). Estos síntomas en el área foliar y sistema radical concuerdan con los reportados por López-López *et al.* (2020); mientras que el mismo agente causal afectando plantas de tomate también se reportó en Brasil, Canadá, EE. UU. y Venezuela (Farr y Rossman, 2022). Asimismo, estos síntomas se registraron en otros hospedantes, como en cebolla china (*Allium fistulosum*) en China (Luong *et al*., 2008). De manera similar, los síntomas de la enfermedad de raíz corchosa y rosada en tomate coinciden con los descritos para *S. terrestris* en cebolla (Schwartz y Mohan, 2008).



gura 2. Síntomas de raíz corchosa y rosada en tomate. A–C) Clorosis, crecimiento ficiente y senescencia en plantas. **D–F)** Lesiones en la raíz de color café oscuro, hinchadas, n textura corchosa y rosada.

sintomatología de raíz rosada puede ser similar a la causada por *Pseudopyrenochaeta copersici*, la cual se registró en un amplio número de hospedantes como sorgo, maíz, caña azúcar (Sprague, 1950), césped (Conners, 1967), puerro (Hall *et al.,* 2007), melón, labacita, trigo y espinaca (USDA, 1960) y en árboles de sauce (Pfleger y Vaughn, 72). Por otra parte en el cultivo de tomate lo han reportado en Australia (Golzar, 2009), frica (Testen *et al*., 2019) Alemania (Valenzuela-López *et al*., 2018) y en EE. UU. como tógeno asociado a la pudrición café de la raíz del tomate (Vrisman *et al*., 2017).

Aislamiento e identificación morfológica

De las muestras de raíces de tomate con síntomas de raíz corchosa y rosada, se obtuvieron ocho aislados fúngicos. La técnica que mejor funcionó para el aislamiento de los hongos fue colocar secciones de tejidos infectados en cámara húmeda para la estimulación de los picnidios en los tejidos de las raíces a temperatura de 4°C (Gilchrist-Saavedra *et al*., 2005).

La colonia fue de color rosa anverso y reverso, con crecimiento radial (80 mm) a los 7 días de crecimiento (Figuras 3A–B). Dichas características de crecimiento del hongo en medio V8A fueron similares a las reportadas por De Gruyter *et al*. (2010).

La examinación morfológica de las estructuras asexuales mostró picnidios globosos a obpiriformes, de color negro a café oscuro (Figura 3C) y de 142–220 × 104–140 µm. Se observó la presencia de setas de color café oscuro, septadas, de 52–114 × 2–8 µm y que rodeaban el cuello ostiolar (Figura 3D). Los conidios fueron hialinos, cilíndricos, de 2–8 × 1–3 µm, y con dos gútulas muy características en sus extremos (Figuras 3E–F). Todos los caracteres morfológicos observados coincidieron con los reportados por otros autores (Cuadro 3). A pesar de que algunas mediciones fueron variables entre sí, estos datos no son contundentes para diferenciar entre una u otra especie, por lo cual se requieren de herramientas moleculares y análisis filogenéticos para la confirmación a nivel de especie.

Cuadro 3. Medidas de estructuras asexuales en aislados de *Setophoma terrestris*.

Setas (µm)	Picnidio (µm)	Conidio (µm)	Referencia
NA	NA	4.5–5.5 × 1.8–2.3	Koenning *et al*., 2007
≈ 100–120	≈ 200	≈ 4–5	Wiriyajitsomboon, 2015
≈ 100	≈ 300	≈5	Yang *et al*., 2017
NA	NA	5.0 × 2.0	Rivedal *et al*., 2018
55–150	160–230	4.0–5.0 × 1.5–2.0	Zhang *et al*., 2019
68–84 × 2–3	237–345 × 105–250	5–7 × 2–3	López-López *et al*., 2020
52–114 × 3–6	150-183 × 133-156	6–7 × 2–3	**CCLF02**
60–108 × 2–5	142-160 × 124-132	6–8 × 2–3	**CCLF03**
46–102 × 3–5	200-233 × 110-130	4–6 × 2–3	**CCLF04**
55–106 × 3–4	220-231 × 105-133	2–3 × 1–1.5	**CCLF05**
67–90 × 2.5–4	216-255 × 104-140	3–4 × 1–2	**CCLF06**

90–107 × 3–8	175-180 × 140-155	5–8 × 2–3	**CCLF07**
60–101 × 3–5	160-175 × 137-153	5–6 × 2–3	**CCLF08**

*NA: No aplica / No se reportaron
* Las mediciones generadas en este estudio se destacan en negrita en referencias.

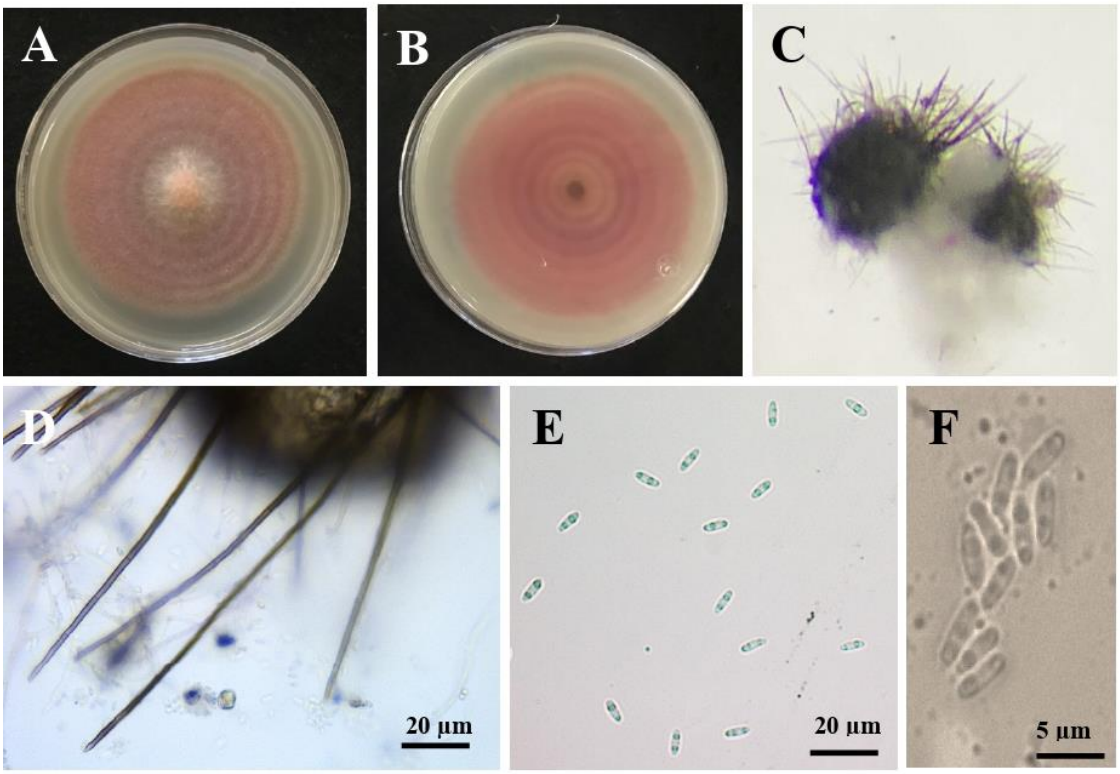


Figura 3. Colonias y estructuras de reproducción asexual de *Setophoma terrrestris*. A) Colonia de *S. terrestris* en medio V8A con 7 días de crecimiento. **B)** Crecimiento de colonia en el reverso de la placa. **D)** Picnidio. **D)** Setas. **E–F)** Conidios gutulados.

Por su parte, Luong *et al.* (2008) identificaron a *S. terrestris* como agente causal de raíz rosada en cebolla utilizando características de la colonia y observaron el pigmento rosa en el medio de cultivo, así como las setas en los picnidios y conidios típicos de este género en algunas raíces rosadas. Además, observaron grandes gútulas en los conidios de sus aislados, las cuales coinciden con las reportadas en este estudio. Estas mismas características microscópicas en los conidios fueron descritas por De Gruyter y Boerema (2002).

Similarmente, Ikeda *et al.* (2012) identificaron como agente causal de raíz rosada en calabacita a *S. terrestris* y obtuvieron dos aislados que formaron picnidios de color café a negro oscuro, de forma subglobosa a globosa y con cuello ostiolar con setas alrededor. Estas setas se observaron de forma cilíndrica y de color café a café oscuro, y sus medidas fueron 104–262 × 3.5–6.9 µm. Estas características y medidas caen en el rango de las obtenidas en los aislados de este estudio.

Por otra parte, las medidas pueden tener ligeras diferencias entre los aislados y lo antes señalado se puede deber a múltiples factores ambientales que afectan el desarrollo del patógeno, tal como lo mencionaron Burton *et al.* (1997), haciendo una relación con los síntomas de la enfermedad en melón y sandía e identificando al agente causal con base en estructuras morfológicas y analisis de secuencias ITS. A diferencia de nuestros aislados, los picnidios reportados por Duarte y Barreto (2015), no cuentan con las típicas setas alrededor del ostíolo, señalando que este atributo no es un carácter genérico. Asimismo, las características que comparten los hongos *P. lycopersici* y *S. terrestris* son muy similares a diferencia que, en *P. lycopersici* las setas de sus picnidios son superiores a 200 µm de longitud, mientras que *S. terrestris* regularmente oscilan desde 50–150 µm aproximadamente (De Gruyter, 2010).

Análisis filogenético

Las secuencias alineadas correspondientes a la región ITS y la subunidad mayor (LSU), resultaron en una longitud total de 1,345 nucleótidos. El análisis filogenético generado con MrBayes basado en el conjunto de datos (Figura 4) mostró que todos los aislados obtenidos en este estudio se agruparon con la especie *Setophoma terrestris*, con un soporte alto de probabilidad posterior (1.0).

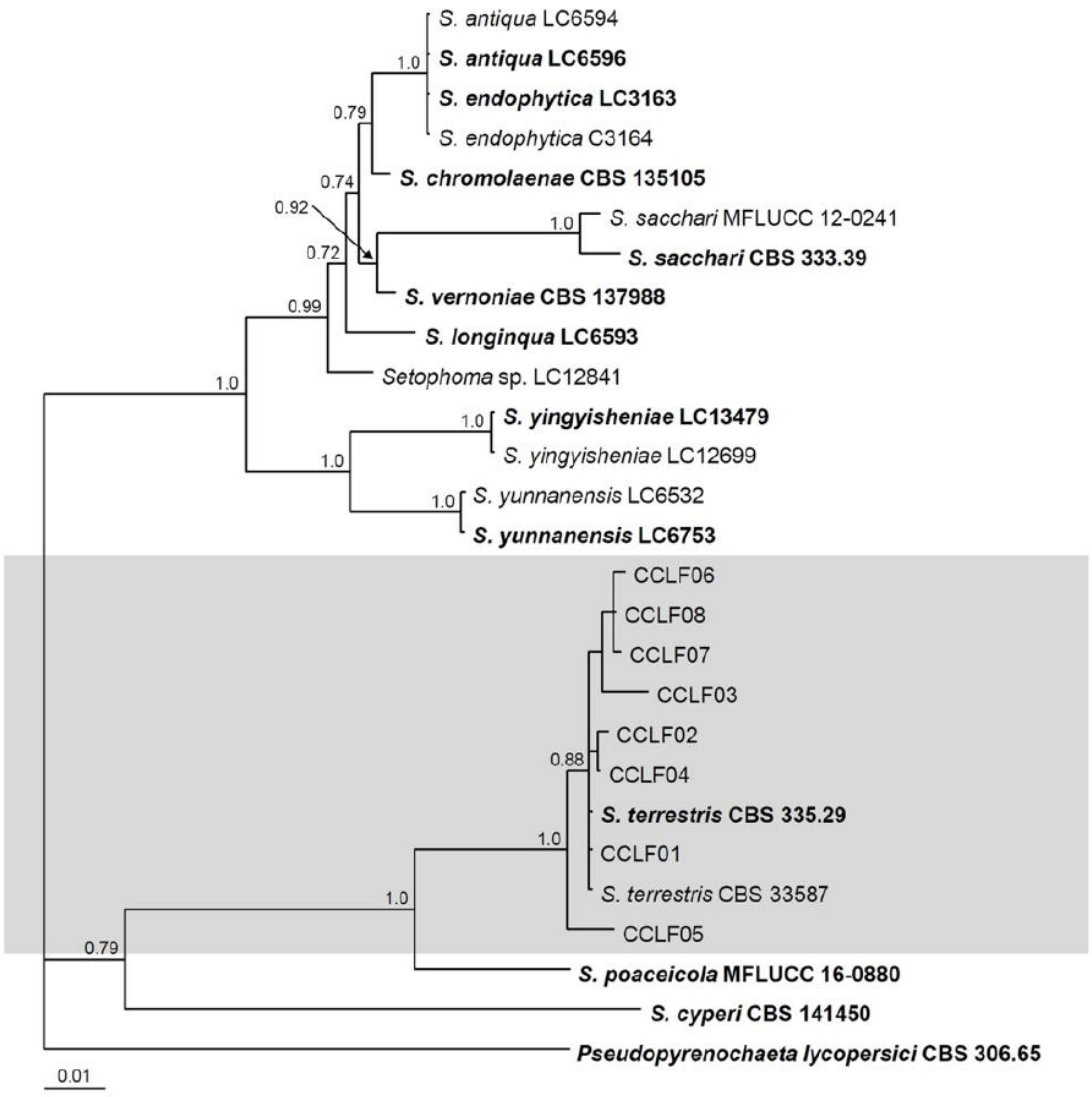


Figura 4. Árbol Bayesiano obtenido con datos combinados de secuencias ITS y LSU. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las especies de *Setophoma*. Los valores de probabilidad posterior Bayesiana por encima de 0.70 se muestran en los nodos. La especie *Pseudopyrenochaeta lycopersici* se utilizó como grupo externo y la barra de escala indica el número de cambios esperados por sitio.

El análisis filogenético de este estudio concuerda con la identidad molecular reportada por Rivedal *et al.* (2018), quienes utilizaron la región ITS, encontrando que el ADN de todos sus aislados mostró una similitud del 99% con *Setophoma terrestris*. Asimismo, esas secuencias también se compararon con las reportadas por De Gruyter *et al*. (2010), obteniendo resultados similares. Por otra parte, Duarte y Barreto (2015) utilizaron el mismo criterio de análisis de

inferencia bayesiana, pero como la diferencia que se apoyaron únicamente en secuencias LSU, mientras que en este trabajo se analizaron secuencias concatenadas ITS y LSU. Esto es de gran importancia ya que en estos años se ha demostrado y avalado que estos géneros son muy cercanos entre sí y se distinguen únicamente al realizar análisis filogenéticos con secuencias concatenadas (De Gruyter *et al.,* 2010). Dicha información es de gran importancia, ya que el género *Phoma* ha crecido para adaptar a más de 3000 especies que forman picnidios con conidios hialinos y septados (Aveskamp *et al*., 2008), reevaluando así varios estudios relacionados con este género al identificarse correctamente (Boerema *et al.,* 2004).

Pruebas de patogenicidad

Treinta días después de la inoculación, las hojas mostraron amarillamiento (Figuras 5A–B), las raíces de tomate inoculadas mostraron textura corchosa y coloración rosada (Figura 5C), los cuales fueron similares a los síntomas observados en campo. De los reaislamientos, se obtuvieron colonias y estructuras fúngicas idénticas a las del hongo inoculado, lo que confirmó la patogenicidad de los ocho aislados inoculados, mientras que las raíces de las plantas control permanecieron asintomáticas.

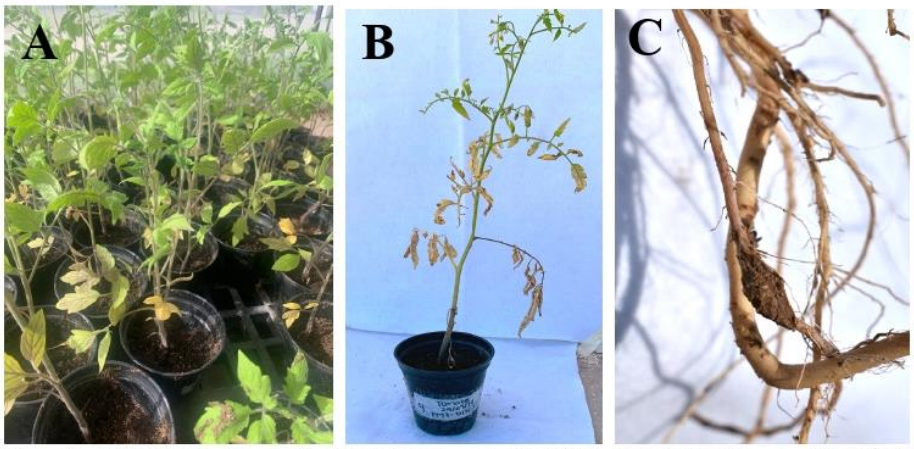


Figura 5. Pruebas de patogenicidad en plantas de tomate. **A–B)** Plantas de tomate inoculadas con *S. terrestris* y mostrando síntoma de amarillamiento. **C)** Síntoma de raíz corchosa a los 30 días después de la inoculación con *S. terrestris*.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad de este estudio, concuerdan con los reportados por Zhang *et al*. (2019), quienes observaron síntomas típicos de raíz rosada en ajo. Asimismo, este patógeno también se ha encontrado causando daño a otros hospedantes como: canola

(*Brassica napus*) en Canadá (Yang *et al.*, 2017), calabacita (*Curcubita maxima*) en EE. UU. (Rivedal *et al.*, 2018), planta del té (*Camellia sinensis*) en China (Liu *et al*., 2019).

Los síntomas observados en las pruebas de patogenicidad del estudio llevado a cabo por Zhang *et al*. (2019), mostraron que *S. terrestris* causó clorosis, marchitez y muerte en plantas de ajo en un lapso de 40 días, dato similar a lo descrito por López-López *et al*. (2020), y que a su vez concuerda con los resultados en este estudio. Esto demuestra que *Pseudopyrenochaeta lycopersici* no es el agente causal de la raíz corchosa en campos de tomate en Sinaloa, México, como se estuvo considerando por mucho tiempo.

Por otra parte, se comprobó que *S. terrestris* es un patógeno de lento crecimiento y desarrollo, ya que en las pruebas de patogenicidad de Rivedal *et al.* (2018) mostraron síntomas de raíz rosada a las 12 semanas después de la inoculación en calabaza de invierno, mientras que en nuestras pruebas fue de 4 semanas, esto pudiera deberse a que la relación patógeno-hospedante es diferente. De manera similar, Yang *et al.* (2017) utilizaron discos miceliales de *S. terrestris* en Canola, observando a los 21 días síntomas de raíz corchosa y rosada, lo cual concuerda con el tiempo aproximado en este estudio. El tiempo que tarda el patógeno en colonizar el tejido vegetal puede verse afectado por las condiciones en las que se encuentre, es decir, después de multiples reactivaciones en medios de cultivo su tasa de crecimiento varia (de Gruyer y Borema, 2002), posiblemente perdiendo así el grado de virulencia original de cada aislado, y por consecuencia, retrasar la visibilidad de los síntomas de la enfermedad en estudio.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la caracterización morfológica, identificación molecular y pruebas de patogenicidad, se confirmó que *Setophoma terrestris* es el agente causal de la enfermedad conocida como raíz corchosa y rosada en campos agrícolas de tomate distribuidos en Culiacán, Sinaloa. Los síntomas que presentaron las plantas de tomate infectadas fue corchosis y raíz rosada, así como, disminución de cantidad de raíces.

LITERATURA CITADA

Allescher A. 1896. Diagnosen einiger neuer, im Jahre 1895 gesammelter Arten bayerischer Pilze, aus der Abteilung der Fungi imperfecti. Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft 4: 31–40.

Aveskamp MM, Gruyter J, Crous PW. 2008. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. Fungal Divers. 31: 1–18

Blancard D, Laterrot H, Marchoux G y Condresse T. 2011. Enfermedades del tomate: identificar, conocer y controlar. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid – México. ISBN: 978-84-8476-427-4.

Bruton BD, Biles CL and Duthie JA. 1997. Pink root of muskmelon and watermelon caused by *Phoma terrestris*. Subtropical Plant Science Journal 49: 34–41

Boerema GH, Gruyter J de, Noordeloos ME, Hamers MEC. 2004. *Phoma* identification manual. Wallingford, UK: CABI Digital Library

Castillo JA y Plata G. 2010. Diagnóstico de raíz rosada utilizando técnicas convencionales y moleculares. Revista de Agricultura – Año 62, Nº 48.

Campbell R, Schweers V and Hall D. 1982. Corky root in California caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and control by soil fumigation. Plant Disease 66: 657-661.

Clerjeau M. 1973. Methode rapide de contamination des jeunes plantules de tomate par *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider & Gerlach. Annales de Phytopathologie. 5 (2): 143-150.

Conners IL. 1967. An Annotated Index of Plant Diseases in Canada and Fungi Recorded on Plants in Alaska, Canada and Greenland. Canada Department of Agriculture Publication. 1251: 1-381. (7870)

Davet P. 1973. Distribution et évolution du complexe parasitaire des racines de tomate dans une région du Liban ou prédomine le *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider et Gerlach. Annual Phytopathology 5: 53-63.

de Gruyter J & Boerema GH. 2002. Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes) VIII. Section Paraphoma: Taxa with setose pycnidia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *17*(4), 541–561.

de Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. 2010. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. Mycologia. 102, 1066-1081. https://doi.org/10.3852/09-240

Duarte LL and Barreto RW. 2015. *Phoma canadensis* Allesch.: a synonym of *Pyrenochaeta cava*. Mycotaxon 130(3): 731-738. (50184)

Farr DF and Rossman AY. 2022. Fungal Databases, Syst. Mycol. Microbiol. Lab., ARS, USDA. Retrieved July 20, 2022, from https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/. Google Scholar.

French A M. 1989. California plant disease host index. California Department of Food and Agriculture, Sacramento, 394.

Gilchrist-Saavedra LG, Fuentes-Dávila C, Martínez-Cano RM, López-Atilano E, Duveiller RP, Singh MH y García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT.

Golzar H. 2009. First report of *Pyrenochaeta lycopersici*, causal agent of tomato corky root rot in Australia. Australasian Plant Disease Notes 4: 126-128.

Hall BH, Hitch CJ, Oxspring EA and Wicks TJ. 2007. Leek diseases in Australia. Australas. Plant Pathology. 36: 383-388. (42032)

Ikeda K, Kuwabara K, Urushibara T, Soyai P, Miki S & Shibata S. 2012. Pink root rot of squash caused by *Setophoma terrestris* in Japan. Journal of General Plant Pathology, 78(5), 372–375.doi:10.1007/s10327-012-0398-2

Jones JB, Zitter TA, Momol TM and Miller SA. 2016. Compendium of tomato diseases and pests. Second edition. American Press Society. ISBN: 978-0-89054-434-1. Pp. 15-119. https://doi.org/10.1094/9780890544341

Liu F, Wang J, Li H, Wang W and Cai L. 2019. *Setophoma* spp. on *Camellia sinensis*. Fungal Systematics and Evolution. 4, 43–57. https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.05

López-López AM, León-Félix J, Allende-Molar R, Lima NB, Tovar-Pedraza JM and García-Estrada RS. 2020. First report of *Setophoma terrestris* causing corky and pink root of tomato in Sinaloa, Mexico. Plant Disease. 104 (5): 1553 https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN .

Luong TM, Huynh LMT, Tran U, Dau VT, Burgess LW, Phan HT, Aveskamp MM, and Vo AD. 2008. First report of *Phoma terrestris* causing pink root rot of Chinese onion in Vietnam. Australasian Plant Disease Notes 3: 147-149.

Martínez-Ruiz FE, Cervantes-Díaz L, Aíl-Catzím CE, Hernández-Montiel LG, Del Toro Sánchez CL y Rueda-Puente EO. 2016. Hongos fitopatógenos asociados al tomate

(*Solanum lycopersicu*m L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. European Scientific Journal June 2016 edition vol.12, No.18 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431. DOI: 10.19044/esj.2016.v12n18p232

Mori Y, Sato Y & Takamatsu S. 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia*, *92*(1), 74-93.

Nylander JAA, 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala Universit. Available from: https://github. com/nylander/MrModeltest2.

Olavarria L. 1991. Caracterización e identificación del agente causal de la enfermedad raíz corchosa en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Taller de licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 59 p.

Page RD. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences. 12, 357–358. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357

Pfleger FL and Vaughn EK. 1972. *Pyrenochaeta terrestris* as a naturally occurring component of the soil in Oregon. Plant Disease. Reporter 56: 180-182. (1345)

Quaedvlieg W, Verkley GJM, Shin H-D, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. Sizing up Septoria. Studies in Mycology 75, 307–390. http://dx.doi.org/ 10.3114/sim0017.

Rivedal HM, Stone AG and Johnson KB. 2018. First report of *Setophoma terrestris* causing pink root rot of winter squash (*Cucurbita maxima*) in Oregon. Plant Disease. 102(12):2661. DOI: 10.1094/pdis-06-18-0921-pdn.

Rivedal HM, Tabima JF, Stone AG and Johnson KB. 2022. Identity and pathogenicity of fungi associated with root, crown, and vascular symptoms related to winter squash yield decline. Plant disease. 106(6):1660-1668. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2090-RE

Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes v. 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology. 61, 539–542. https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029.

Schneider R. 1984. The genus *Pyrenochaeta* De Not. In: Taxonomy of Fungi, part 2. C.V. Subramanian. ed. Amra Press, Madras. pp. 513-524.

Schwartz HF and Mohan SK. 2008. Compendium of onion and garlic diseases. 2nd ed. American Phytopathological Society Press: St Paul, MN.

SIAP. 2020. https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119 Fecha de consulta: junio del 2020.

Sprague R. 1950. Diseases of Cereals and Grasses in North America. Ronald Press Company, New York, 538 pages. (1061)

Staden R, Beal KF and Bonfield JK. 1998. The Staden package, 1998. In: Misener, S., Krawetz, S.A. (Eds.), Bioinformatics Methods and Protocols, vol. 132. Methods Mol Biol, pp. 115–130. https://doi.org/10.1385/1-59259-192–2:115.

Takamatsu S and Kano Y. 2001. PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. Mycoscience, 42(1), 135–139.doi:10.1007/bf02463987

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution. 38(7), 3022–3027. https://doi:10.1093/molbev/msab120

Testen AL, Chala A, Azerefegne F, and Miller SA. 2019. First report of corky root rot of tomato caused by *Pyrenochaeta lycopersici* in Africa. Pl. Dis. 103(5): 1033.

USDA. 1960. Index of Plant Diseases in the United States. Agric. Handb. 165: 1-531. (94)

USDA. 2017. Fecha de consulta: mayo del 2017. https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/

Valenzuela-Lopez N, Cano-Lira JF, Guarro J, Sutton DA, Wiederhold N, Crous PW and Stchigel AM. 2018. Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. Studies in mycology 90: 1–69.

Vrisman CM, Testen AL, Elahi F and Miller SA. 2017. First report of tomato brown root rot complex caused by *Colletotrichum coccodes* and *Pyrenochaeta lycopersici* in Ohio. Plant Disease. 101(1): 247.

Yang Y, Zuzak K, Harding M, Neilson E, Feindel D and Feng J. 2017. First report of pink root rot caused by *Setophoma* (*Pyrenochaeta*) *terrestris* on canola. Canadian Journal of Plant Pathology. 39:3, 354-360, DOI: 10.1080/07060661.2017.1355849.

Zhang FB, Zheng HL, Zhang MQ, Yin YS, Cui M and Gao M. 2019. First report of *Setophoma terrestris* causing pink root of garlic in China. Plant Disease. 103(3):584 DOI 10.1094/PDIS-03-18-0530-PDN.

4. HISTOPATOLOGÍA DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Setophoma terrestris* EN RAÍCES DE TOMATE

Ana María López-López, **Juan Manuel Tovar-Pedraza, Josefina León-Félix,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México; **Raúl Allende-Molar,** Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México; **Isabel Cruz-LaChica, Raymundo Saúl García-Estrada,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México. Correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

RESUMEN

Setophoma terrestris es el agente causal de la raíz corchosa y rosada en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). A nivel nacional existen escasos estudios relacionados con este hongo; sin embargo debido a las pérdidas que ocasiona, es importante realizar un estudio integral en donde se aborde el proceso de infección del hongo que incluya las etapas de colonización, penetración y establecimiento dentro de la planta hospedante. En este estudio se determinó que, en una inoculación por medio de discos de medio de cultivo con crecimiento activo del hongo sobre las raíces de plantas de tomate, a las 24 h el hongo comenzó a colonizar la epidermis de la raíz. Entre los 4 y 9 días después de la inoculación (ddi) el hongo se extendió muy marcadamente en los tejidos y a los 17 ddi, se observaron algunas estructuras presuntivamente de compuestos fenólicos y la coloración rosada en las células de la raíz de las áreas afectadas. Finalmente, a los 33 ddi, se observó la invasión total de la raíz por parte del micelio de *Setophoma terrestris*.

ABSTRACT

Setophoma terrestris is the causative agent of corky and pink root in tomato (*Solanum lycopersicum*) crops. Little has been studied about this fungus at a national level, and due to crop losses, it is of great importance to carry out a comprehensive study. where the infection process of the fungus under study is addressed in order to take measures and learn more about the stages in which it begins to colonize, penetrate and disperse. In this study it was possible to identify after how many days it began to cause extreme damage to the root system of the plant. At 24 h the fungus began to colonize the epidermis of the root, disseminating on days 4 and 9 post inoculation, on day 17 some presumably CF structures and pink coloration in the root cells were observed, finally, the total entry was observed. of the pathogen on day 33 post inoculation in tomato.

INTRODUCCIÓN

Setophoma terrestris, es el agente causal de la raíz corchosa y rosada, enfermedad que se caracteriza por afectar al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y a un amplio rango de hospedantes cultivados en México. Las especies de *Setophoma* emplean diferentes estrategias de infección que aún no han sido reportadas o estudiadas en distintos hospedantes (Rivera-Méndez *et al.*, 2021). Las estrategias de infección están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), por lo que es importante conocer el proceso de infección para determinar el ciclo biológico de la enfermedad, lo que podría sugerir el uso adecuado de una estrategia de control al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante. La raíz corchosa y rosada es una de las principales enfermedades en el cultivo del tomate. En México, las pérdidas máximas reportadas se han evaluado en un 15% del valor total de la producción (SIAP *et al.*, 2020). *Setophoma terrestris* se reportó en 2019 como causante de raíz corchosa y rosada de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México (López-López *et al.*, 2020), con una incidencia que oscila del 10 al 20%. Esta especie utiliza mecanismos de infección distintos, ya que se comporta como patógeno hemibiotrófico intracelular en cebolla (*Allium cepa*), melón (*Cucumis melo*) y pepino (*Curcubita maxima*) (Orio *et al.*, 2016) y como patógeno descrito en un proceso de infección aún no hay reportes encontrados. Aunque existen diversos estudios relacionados con este hongo donde aborda que es de lenta colonización y crecimiento (Rivera-Mendez *et al.*, 2018), se desconoce el proceso de patogénesis en las raíces del cultivo de tomate; además, existe nula información en donde se describa el proceso de infección de *Setophoma* en tomate y otro hospedante. El objetivo de este estudio es describir el proceso histopatológico que ocurre durante la infección de raíces de tomate por *S. terrestris*.

Materiales y Métodos

Inoculación de plántulas

Se utilizó un aislado representativo de *S. terrestris* de la Colección de Cultivos de Hongos

Fitopatógenos del Centro de Investigación en Alimentación y el Desarrollo (no. acceso CCLF02) como inóculo. Se utilizaron discos de agar con inóculo de micelio a partir de un cultivo de siete días de crecimiento en V8 acidificado. Se utilizó la raíz principal del sistema radical de plántula de tomate para inocular el disco micelial del aislado y posteriormente se cubrió con papel Parafilm; posteriormente, se colocó de nuevo la planta en la maceta. En el experimento también se incluyeron plantas control en las cuales la inoculación consistió en la colocación de discos de medio de cultivo V8 acidificado sin crecimiento del hongo. Todas las plantas inoculadas se mantuvieron bajo riego por 30 días aproximadamente. En el tiempo cero se extrajeron dos plantas tipo control (sin hongo activo), posteriormente durante los días 1, 2, 3, 4 y 5 se extrajeron tres raíces inoculadas y una tipo control; después del quinto día se realizaron extracciones de raíces a los 9, 13, 17, 21, 25, 29, 3, 27 y 41 días. Después de cada extracción de raíces, éstas fueron colocadas en frascos de cristal ésteriles y fijadas mediante inmersión en solución formaldehido ácido acético (FAA), hasta su próximo uso. Posteriormente, se colocaron en casetes de plástico para incluirlas en parafina paraplast (Sigma).

Tinción de tejidos y observación al microscopio

Las muestras se sumergieron nuevamente en solución fijadora FAA (10 % formaldehido, 5 % ácido acético, 50 % etanol al 96%) durante al menos 24 h. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron gradualmente con alcohol etílico (50, 70, 80, 96 y 100%) y se infiltraron en parafina paraplast (Sigma) durante 3 h, previa transferencia en alcohol absoluto-xileno (v/v) y xileno (dos veces) (Rodríguez-López *et al.,* 2013). Las muestras permanecieron en las soluciones durante 3 h y finalmente, se agitaron dos veces en un procesador de tejidos (Thermo Scientific, STP 120, GER). En un centro de inclusión (Thermo Scientific, HistoStar, UK), las muestras se colocaron en moldes metálicos con parafina fundida, se les colocó un casete de plástico, se agregó parafina fundida y se dejaron enfriar. Las muestras se cortaron de forma transversal con respecto a la raíz inoculada con 10 µm de grosor en un micrótomo semiautomático (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER), después se adhirieron a portaobjetos con adhesivo Haupt y agua en un calentador de portaobjetos (Thermo Fisher Scientific, Beverly, MA, EE. UU.) a 40 °C durante 24 h. Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina (Sigma) al 1 % en alcohol etílico al 50 % y verde-rápido (Sigma) al 1 %

en etanol al 96 %, se montaron en resina Entellan (Merck) y se secaron durante 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). Las laminillas se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axiostar Imager A2 (Carl Zeis, Oberkochen, Alemania) con cámara integrada para identificar los daños en tejido. Se realizaron 36 observaciones por muestra. Las estructuras se midieron con el software ZEN 2012 (blue edition).

Resultados y Discusión

A las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) se observó el 33% de la epidermis de la raíz cubierta por el hongo (Fig. 1A), y a las 48 hdi el micelio del hongo había cubierto el 75% de la epidermis de la raíz desde un ángulo transversal (Fig. 1B). A los 4 ddi, se observó la penetración de las hifas del micelio de *S. terrestris* en el parénquima cortical (Fig. 1C), al ser un hongo de lenta colonización, hasta el día 9 después de la inoculación, se observó la presencia de micelio ingresando al cilíndro vascular (Fig. 1D), específicamente en floema. Al día 17 ddi, se determinó la presencia de algunos compuestos entre los espacios intercelulares de las células de xilema y floema (Fig. 1E), los cuales podrían tratarse de células taníferas, compuestos fenólicos o incluso almidón. De la misma forma, a los 29 ddi, también se observó el inicio de la presencia de pigmentaciones en las células afectadas, las cuales coincidían con lo descrito en la enfermedad conocida como raíz rosada y corchosa dentro del xilema y floema (Fig. 1F-G). Finalmente, a los 33 ddi, se observó la colonización total de los tejidos de la raíz, con la obstrucción total del hongo en el cilindro vascular, lo que a su vez causa que se impida el flujo de agua y nutrientes a la parte foliar. Con ello, el follaje de las plantas se marchita y finalmente mueren (Fig. 1H).

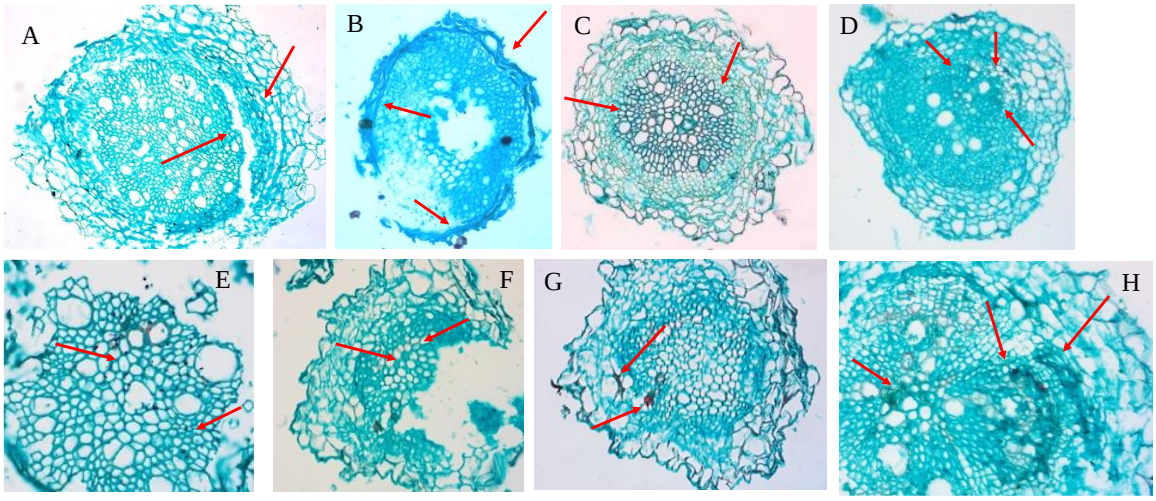


Fig. 1. Histopatología de raíces de tomate durante el proceso de infección por *Setophoma terrestris***.** A-B) 24 y 48 hdi el hongo invadió la epidermis de la raíz de tomate en corte transversal, C) 4 ddi se observa entrando al parénquima cortical de la raíz, D) a los 9 ddi el hongo ingresó al cilindro vascular (floema), E); a los 17 ddi se observan estructuras alrededor de xilema y floema, F-G) a los 29 ddi se observan las primeras células pigmentadas de rosa y H) finalmente a los 33 ddi obstrucción total del xilema y floema por parte del hongo y muerte de la planta.

Al igual que otros hongos de importancia económica con origen en el suelo, *Setophoma terrestris* demora en causar síntomas foliares visibles, pero cuando se presentan, la enfermedad es irreversible. La penetración del hongo requiere que existan heridas en la raíz principal del hospedante. Cuando se daña la epidermis de las raíces, las hifas del hongo juegan un papel muy importante en la penetración de la parte interna de la raíz, así como en el desarrollo de la enfermedad o patogénesis (Struck 2006) la cual ocurrió a las 24 hpi. El hongo emplea diferentes mecanismos para unirse a la superficie de la planta hospedante. En cualquier caso, la penetración del hongo en la planta precisa del contacto y la adherencia de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie vegetal. Los mecanismos por los cuales este proceso se consigue han sido poco estudiados. Un posible mecanismo consiste en la excreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y esterasas que alteran la superficie vegetal facilitando la adherencia (Jiménez-Díaz, 2000). El proceso de germinación de las esporas fúngicas se inicia, al igual que en las semillas de las plantas, con la hidratación y aumento de volumen de la espora, la hidrólisis de las reservas energéticas endógenas y la síntesis de proteínas y materiales estructurales de membrana y pared necesarios para la formación y elongación de los tubos germinativos. La germinación de los conidios en el caso de Setophoma sucede en los picnidios, sin embargo,

demoran tiempo para su formación, por lo cual en este estudio manejamos para colonizar el micelio el cual es altamente patogénico. En muchas ocasiones el micelio se encuentra en un estado de reposo metabólico, en el que el crecimiento micelial se ve impedida por varios factores físicos o bioquímicos propios del hongo y pueden llegar a compactarse hasta encontrar factores de crecimiento, tal cual es el caso de los microesclerocios, ya que manifiesta una orientación en respuesta a estímulos químicos o de contacto superficial. El crecimiento orientado del tubo germinativo requiere su adherencia a la superficie del vegetal, lo cual tiene lugar mediante la producción de una matriz extracelular de polisacáridos o glicoproteínas. Esta investigación histopatológica de la infección por *Setophoma terrestris* en raíces de tomate, mejora la comprensión del establecimiento y desarrollo del hongo, que rápidamente cubrió, pero demoro en colonizar e hizo difícil su manifestación de síntomas al pasar de los días, reportándose un daño irreversible a los 33 días aproximadamente. Esto pudiera deberse al comportamiento biotrófico del hongo (Biles *et al.,* 1992), que, en el caso de las cebollas, este infecta las raíces y provoca una disminución en el tamaño, diámetro y peso de los bulbos, por otra parte, en nuestro estudio con tomate se observa el mismo síntoma en las raíces, provoca un crecimiento bajo de la planta, pocos frutos y por ende bajo rendimiento del mismo. Asimismo, en cebolla las raíces muestran una coloración rosa característica, además de la formación de picnidios globosos de color marrón oscuro o negro que aparecen al final del ciclo vegetativo del cultivo. Sin embargo, en nuestro estudio además de evidenciarse este síntoma característico se observa la corchosis en las raíces, lo cual difiere de otros estudios en donde reportan que *S. terrestris* no provoca pudriciones ni deformaciones (Albuquerque y Araujo, 2008). Las heridas en las raíces además de factores bióticos y abióticos son condiciones determinantes para el desarrollo de la enfermedad, por lo que se evitar en su mayor parte que estas se manifiesten para reducir las pérdidas de cosecha a causa de este patógeno.

REFERENCIAS

Albuquerque E and Araujo E. 2008. Factors that determine the onion pink root caused by *Pyrenochaeta terrestris*. Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronomica 5: 264–298.

Biles CL, Holland M, Ulloa-Godinez M, Clason D and Corgan J. 1992. *Pyrenochaeta terrestris* microsclerotia production and pigmentation on onion roots. Hortscience. 27(11): 1213–1216.

Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutiérrez-Alonso G. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Revista Mexicana de Fitopatología. 20: 88-93. Disponible en línea: http://www.socmex□- to.org/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya- carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeospo- rioides-penz

Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Soto-Estrada A and Adaska- veg, JE. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotri- chum acutatum* on almond. Phytopathology. 95:751-758. http://dx.doi.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0751

Jiménez-Díaz RM. 2000. Interacciones planta-hongo. Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología (aut.), Vol. 2, 2000, ISBN 84-7114-900-1, págs. 739-769https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=309036

Latunde-Dada AO and Lucas JA. 2007. Localized hemibio- trophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxo- nomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. Plant Pathology. 56:437–44. http://dx.doi. org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x/epdf

López-López AM, León-Félix J, Allende-Molar R, Lima NB, Tovar-Pedraza JM and García-Estrada RS. 2020. First report of *Setophoma terrestris* causing corky and pink root of tomato in Sinaloa, Mexico. Plant Disease. 104 (5): 1553 https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN .

O´Connell RJ, Uronu AB, Waksman G, Nash C, Keon JPR and Bailey JA. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. Plant Pathology. 42:774-783. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993. tb01564.x

Orio, A. G. A., Brücher, E., y Ducasse, D. A. 2016. Una cepa de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* muestra una actividad antagónica específica contra el patógeno transmitido por el suelo de la cebolla *Setophoma terrestris*. Revista Europea de Patología de Plantas, 144(1), 217-223.

Perfect SE, Hughes HB, O´Connell RJ and Green JR. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biolo- gy. 27:186-198. http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143

Pring RJ, Nash C, Zakaria M and Bailey JA. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. Physio- logical and Molecular Plant Pathology. 46:137-152. http:// dx.doi.org/10.1006/pmpp.1995.1011

Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J. & Alvarado-Marchena, L. 2021. Efecto de *Setophoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum* y *Trichoderma* spp. en los tejidos de la raíz de la cebolla *in*

vitro (*Allium* cepa) y el rendimiento final en el campo. Eur J Plant Pathol 160, 53-65. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02220-z

Rivera-Mendez W, Fuentes-Alfaro R, Courrau- López K, Aguilar-Ulloa W, Zúñiga-Vega C and Brenes-Madriz J. 2018. Biological control of *Setophoma terrestris* isolated from onion rhizosphere in Costa Rica, Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2018.1548258

Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. Revista Brasileira de Fruticultura. 35:898-905. Disponible en línea: http:// www.scielo.org.mx/pdf/rm□/v27n1/v27n1a7.pdf

SIAP. 2020. https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119 Fecha de consulta: junio del 2020.

Struck C. 2006. Infection strategies of plant parasitic fungi. In: Cooke BM, Kaye B, Jones DG (eds) The epidemiology of plant diseases. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 117–131

5. RESPUESTA DE PORTAINJERTOS DE TOMATE A LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *Setophoma terrestris*

Ana María López-López, **Juan Manuel Tovar-Pedraza, Josefina León-Félix,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México; **Raúl Allende-Molar,** Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, 92895, Veracruz, México; **José Benigno Valdéz-Torres, Raymundo Saúl García-Estrada,** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán, 80110, Sinaloa, México. Correspondencia: rsgarcia@ciad.mx

Por enviar a la revista:

Revista Fitotecnia Mexicana

RESUMEN

El hongo *Setophoma terrestris* es el agente causal de raíz corchosa y rosada en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de los principales portainjertos de tomate utilizados en Sinaloa para el manejo de la enfermedad causada por *S. terrestris*. Para ello, se inocularon 15 plantulas de cada uno de cinco portainjertos: Aorta (Syngenta®), DR0141TX (De Ruiter®), Multifort (De Ruiter®), TOP 2010 (Top Seeds®) y TOP 2024 (Top Seeds®), con discos miceliales de dos aislados de *S. terrestris* (uno altamente virulento y otro poco virulento), además de incluir un híbrido de tomate altamente susceptible (8444). La evaluación de la severidad de la enfermedad en raíces se realizó a los 35 días después de la inoculación mediante la medición de la longitud de las lesiones. Se utilizó el programa Minitab 19 para realizar el análisis estadístico bifactorial. La variedad de tomate más susceptible en el estudio fue 8444. Los portainjertos de tomate Aorta, TOP 2024 y Multifort mostraron la mayor tolerancia a la enfermedad, obsevándose lesiones más pequeñas comparadas con las que presentaron los portainjertos DR0141TX y TOP 2010.

ABSTRACT

Setophoma terrestris fungus is the causative agent of corky and pink roots in tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.). The objective of this study was to evaluate the response of the main tomato rootstocks used in Sinaloa for the management of the disease caused by *S. terrestris*. For this, 15 seedlings of each of five rootstocks were inoculated: Aorta (Syngenta®), DR0141TX (De Ruiter®), Multifort (De Ruiter®), TOP 2010 (Top Seeds®) and TOP 2024 (Top Seeds®) with mycelial discs of two isolates of S. terrestris (one highly virulent and one low virulent), as well as including a highly susceptible tomato hybrid (8444). The evaluation of the severity of the disease in roots was carried out 35 days after inoculation by measuring the length of the lesions. The Minitab 19 program was used to perform the bifactorial statistical analysis. The most susceptible tomato variety in the study was 8444. On the other hand, the Aorta, TOP 2024 and Multifort tomato rootstocks showed greater tolerance to the disease, with smaller lesions being observed compared to those of the DR0141TX and TOP 2010 rootstocks.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Setophoma terrestris* es el agente causal de raíz corchosa y rosada en cultivo de tomate (López-López *et al.*, 2020), para el manejo de la enfermedad no se ha evaluado el efecto del hongo en portainjertos de tomate utilizados en Sinaloa para controlar enfermedades con origen en el suelo.

Durante 2017 y 2018, se identificaron aislados de *S. terrestris* causando raíz corchosa y rosada en Sinaloa, México. Las plantas de tomate generalmente mostraban síntomas de clorosis, achaparramiento, pocos frutos y lesiones en las raíces que conforme el tiempo se prolongaron a lo largo de la raíz y se tornaron de un color rosado (Deadman 2017). Hasta 2005, el bromuro de metilo era un recurso para el manejo de enfermedades transmitidas por el suelo en las cucurbitáceas, pero el Protocolo de Sanidad Vegetal ha eliminado su uso en la producción de hortalizas en México (Davis et al. 2008). Debido a los impactos negativos hacia el medio ambiente y la salud humana con respecto al control químico, se han estipulado una serie de controles para el manejo de esta enfermedad. Dentro de los controles, tenemos en la actualidad a nivel mundial el interés general del uso de portainjertos resistentes a enfermedades, los cuales se basan en la siembra de portainjertos interespecíficos de origen silvestre resistentes a determinados patógenos del suelo en este caso a *S. terrestris*, ayudando además a mejorar el rendimiento de los cultivares normales con relación a las que no tienen resistencia (Lee, 1994). La resistencia, es la capacidad de una planta portadora de uno o más genes de resistencia capaces de inhibir la reproducción de un patógeno. Por lo tanto, los portainjertos a diferencia de las variedades tradicionales, son híbridos interespecíficos entre *S. lycopersicum* x *S. habrochaites* u otras especies silvestres de *Solanum*, que son las responsables del aporte de mayor vigor a los patrones (Cortada *et al.*, 2010). Los mecanismos mediante los cuales los portainjertos controlan los patógenos transmitidos por el suelo pueden ser una función de la resistencia del huésped, el aumento de la biomasa de las raíces, los perfiles de exudado de las raíces y las alteraciones de los taxones microbianos de la rizosfera. Los suelos de rizósfera de tomate (*Solanum lycopersicum*) albergan una mayor diversidad microbiana que de otras solanaceas, posiblemente creando más competencia por patógenos transmitidos por el suelo (Ling et al. 2015; Song et al. 2016).

La mayoría de los portainjerto de tomate son híbridos complejos entre el lycopersicon de *Solanum*

y las especies silvestres de tomate como *Solanum habrochaites* (ex-*Lycopersicon hirsutum*) o *Solanum chilense*. Los portainjerto promueven el crecimiento de las plantas, aumentan el rendimiento y la tolerancia a las bajas temperaturas. Además, reducen el daño del patógeno porque portan genes de resistencia contra virus, hongos, bacterias y nematodos de los nudos de la raíz (Ioannou, 2001; De Miguel, 2002; Louws *et al.*, 2010).

Dentro de los portainjertos que se conocen como tolerantes a enfermedades con origen en el suelo son Multifort y Maxifort (Verdejo-Lucas *et al.*, 2012), utilizados como medio de control para enfermedades causadas por nématodos como *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica* en cultivares de tomate.

Se han encontrado estudios en donde abordan a los portainjertos para evaluar el tamaño y rendimiento de los cultivos, sin embargo no arrojan información importante sobre tolerancia a enfermedades, dentro de ellos se encuentran los portainjertos Multifort y DR0141TX, en donde observan un mayor grosor de tallo durante el trascurso del tiempo, pero no evidencian tolerancia ante patógenos (Gong *et al.*, 2022)

Poca investigación ha examinado los impactos de los portainjertos de tomate para controlar las enfermedades causadas por especies de *S. terrestris*, es por eso que este estudio se evaluaron diferentes portainjertos comerciales con respuesta a la tolerancia de la enfermedad de raíz corchosa y rosada en Sinaloa, México.

Materiales y Métodos

En un invernadero se inocularon 180 plantas (Fig 1A) en total, de las cuales se inocularon 15 plantulas de cada uno de cinco portainjertos: Aorta (Syngenta®), DR0141TX (De Ruiter®), Multifort (De Ruiter®), TOP 2010 (Top Seeds®) y TOP 2024 (Top Seeds®) con discos miceliales de dos aislados de S. terrestris (uno altamente virulento y otro poco virulento), además de incluir un híbrido de tomate altamente susceptible (8444). La evaluación de la severidad de la enfermedad en raíces se realizó a los 35 días después de la inoculación, extrayendo y haciendo un lavado de raíces (Fig 1B) y, posteriormente se realizó medición de la longitud de las lesiones (Fig 1C). Por último, se utilizó el programa Minitab 19 para realizar el análisis estadístico bifactorial.

Fig. 1. A) Portainjertos e híbrido de tomate tolerante a enfermedades con origen en el suelo en invernadero, **B)** Extracción y lavado de raíces con lesiones de raíz corchosa y rosada en tomate, **C)** medidos con regla métrica y vernier manual.

Portainjertos

Se seleccionaron los cinco portainjertos más utilizados por su resistencia a enfermedades causadas por hongos con origen en el suelo, los cuales son: Multifort y DR0141TX (De Ruiter Seeds), Variedad Resistente de Syngenta y Top Seed 2000 y 20010 de MontSanto y uno susceptible 8444. Llevado a cabo en macetas de plástico, con mezcla de tierra y sustrato. No se incluyó nutrientes adicionales ni indicaciones específicas.

Aislados y producción de inóculo de *S. terrestris*

Así mismo, se utilizaron dos aislados de *S. terrestris*: uno muy virulento (FM7pic2) y otro con menor grado de virulencia (1.7), reactivados en medio de cultivo V8 agar acidificado, de aproximadamente 8 días de crecimiento y en condiciones medio ambiente como temperatura a 28-

30ºC, cubierta la orilla de la caja petri con papel Parafilm como prevención ante alguna contaminación. Estos aislados fueron inoculados en los 6 portainjertos con 15 réplicas por cada uno. Diseño de dos factores (inóculos y portainjertos) totalmente al azar. El diseño para el daño en la raíz no tiene el tiempo como factor, las mediciones se harán en la última semana del diseño (semana k) la cual definirá la vida del portanjerto susceptible. Con ayuda de un sacabocado una vez reactivado el hongo se procederá a tomar discos miceliales de 4 mm de diámetro y posteriormente se colocará sobre la raíz principal de cada plántula a inocular, se sostendrá con ayuda de un fragmento de papel Parafilm y se regresará a su maceta en condiciones de riego diario dentro de un invernadero. Al finalizar los 35 días desde que se realizaron las inoculaciones se extrajeron las raíces de las plantas y se midieron los daños con ayuda de un vernier, registrando sus medidas en una hoja Excel para posteriormente ingresar la información al programa Minitab 19 y se realizó una ANOVA de dos factores. Como unidad experimental se tienen los portainjertos y como variable de respuesta el diámetro de la lesión (mm).

Resultados y discusión

Dentro de los resultados observamos que no hubo un comportamiento significante entre el comportamiento que se hubiera predecido por el grado de virulencia entre ambos aislados utilizados.

Esto pudiera deberse al mecanismo de ataque de la planta en donde se comporto de la misma forma para tanto el aislado altamente virulento como el aislado poco virulento.

La variedad de tomate más susceptible en el estudio fue 8444, en donde se observaron lesiones más prolongadas y de mayor diamétro que en los portainjertos. Por otra parte, los portainjertos de tomate Aorta, TOP 2024 y Multifort mostraron mayor tolerancia a la enfermedad, siendo visibles lesiones más pequeñas comparadas con las que presentaron los portainjertos DR0141TX y TOP 2010, en las mediciones (Fig. 2).

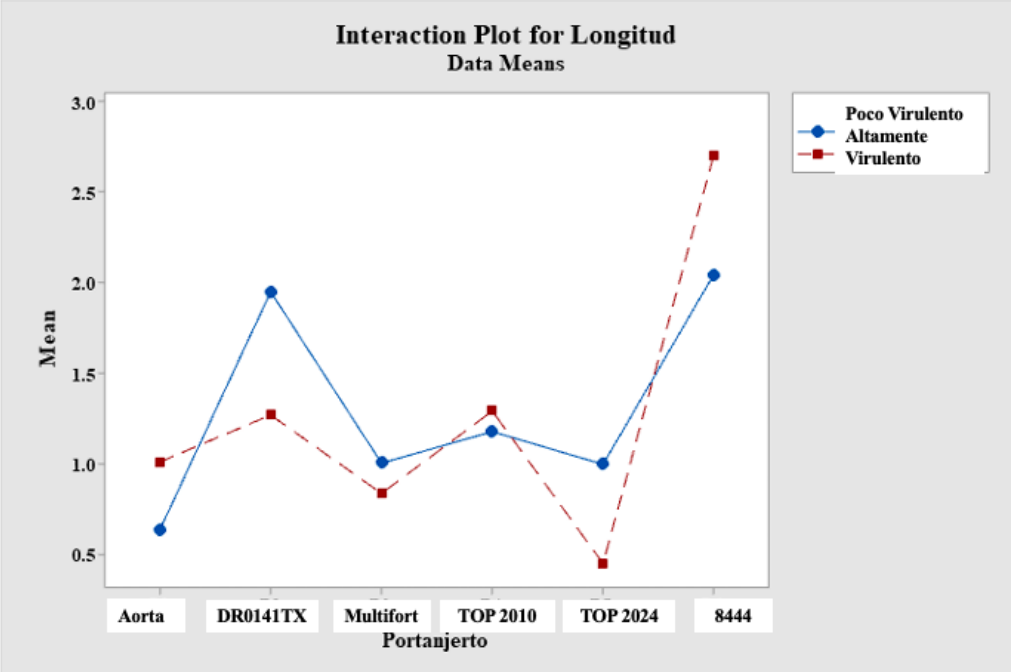


Fig. 2. Gráfica de interacción de medias en portainjertos de tomate y aislados de *S. terrestris.*

En el eje de las "x" de la Figura 2 se observan los 5 portainjertos de tomate utilizados (Aorta, DR0141TX, Multifort, Top 2010 y 2024) y por último la variedad susceptible (tomate 8444), esta última variedad fue la que se utilizó más en el campo en donde observamos síntomas de la enfermedad de raíz corchosa y rosada en tomate.

Por otra parte, en el eje de las "y" podemos observar el diámetro de las lesiones (mm) obtenidas en la extracción de raíces después de la inoculación. Este refleja en un mayor número de diámetro un daño proporcional a la planta causado por el hongo.

Por último, podemos observar los puntos azules los cuales representan el aislado utilizado con poca virulencia, mientras que los puntos rojos señalan los daños causados por el aislado catalogado como el altamente virulento dentro de los aislados obtenidos en nuestro estudio.

El portainjerto que mostró mejor respuesta a la tolerancia de la enfermedad según los resultados fue Multifort lo cual concuerda con lo reportado por Báez-Valdéz (2010) con respecto a enfermedades con origen en el suelo.

Entre de los portainjertos que fueron mayormente tolerantes a la enfermedad de raíz corchosa y rosada en tomate se encontró Multifort, portainjerto que coincide en el estudio de Verdejo-Lucas y colaboradores (2017) con enfermedades con origen en el suelo, a diferencia de este estudio

trabajaron con nemátodos y su portainjerto que obtuvo mayor resistencia fue Maxifort a comparación de otras variedades susceptibles.

CONCLUSIÓN

El mejor portainjerto en cepas virulentas es el TOP 2024 y en poco virulenta el Aorta. Por otra parte, Multifort fue el mejor mejor en ambas cepas con diferente virulencia. El material vegetal más susceptible fue la variedad 8444 y el portainjerto DR0141TX.

REFERENCIAS

Báez-Valdez, E. P., Carrillo-Fasio, J. A., Báez-Sañudo, M. A., García-Estrada, R. S., Valdez-Torres, J. B., & Contreras-Martínez, R. (2010). Uso de portainjertos resistentes para el control de la fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Condiciones de mallasombra. Revista Mexicana de FGitopatología, 28(2), 111-123

Cortada, L.; Sorribas, C. J.; Ornat, C.; Andrés, M. F.; verdejo-Lucas, S. 2010. Patrones de tomate resistentes a *Meloidogyne*: variabilidad de la respuesta de resistencia en función de la población del nematodo. Horticultura Global 288: 40-45.

Davis A, Perkins-Veazie P, Sakata Y, López-Galarza S, Maroto JV, Sang-Gyu L, Yun-Chan H, Zhanyong S, Miguel A, King SR, Cohen R, and Jung-Myung L. 2008. Cucurbit Grafting. Critical Reviews in Plant Sciences. 27:1, 50-74

Deadman M. 2017. Pythium damping off and root-rot. In: Keinath AP, Wintermantel WM, Zitter TA,editors. Compendium of cucurbit diseases and pests. Saint Paul: APS Press; p. 48–50

De Miguel, A., 2002. Grafting as a non-chemical alternative to methyl bromide for tomato in Spain. In: Bachelor, T., Bolivar, J. (Eds.), Proceedings of International Conference on Alternatives to Methyl Bromide: "The Remaining Challenges". Sevilla, Spain, pp. 283e284. Gong, T., Zhang, X., Brecht, J. K., Black, Z. E., & Zhao, X. 2022. Grape Tomato Growth, Yield, and Fruit Mineral Content as Affected by Rootstocks in a High Tunnel Organic Production System, HortScience, 57(10), 1267-1277. Retrieved Jul 11, 2023, from https://doi.org/10.21273/HORTSCI16553-22

Ioannou, N., 2001. Integrating soil solarisation with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. J. Hort. Sci. Biotechnol. 76, 396e401.

Lee, J.M. 1994. Cultivation of grafted vegetables. I. Current status, grafting methods, and benefits. HortScience, 29, 235-239

Ling N, Song Y, Raza W, Huang Q, Guo S, Shen Q (2015). The response of root-associated bacterial community to the grafting of watermelon. Plant Soil 391:253–264.

López-López A.M., León-Félix J., Allende-Molar R., Lima N.B., Tovar-Pedraza J.M. y García-Estrada R.S. 2020. First report of *Setophoma terrestris* causing corky and pink root of tomato in Sinaloa, Mexico. Plant Disease 104(5):1553. DOI: 10.1094/PDIS-10-19-2226-PDN.

Louws, F.J., Rivard, C.L., Kubota, C., 2010. Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. Scientia Horti- cult. 127, 127e146.

Song Y, Ling N, Ma J, Wang J, Zhu C, Raza W, Shen Y, Huang Q, Shen Q. 2016. Grafting resulted in a distinct proteomic profile of watermelon root exudates relative to the un-grafted watermelon and the rootstock plant. J Plant Growth Regulation 35:778-791

Verdejo-Lucas S, Blanco M, Cortada L, Sorribas J. 2013. Resistance of tomato rootstocks to Meloidogyne arenaria and Meloidogyne javanica under intermittent elevated soil temperatures above 28 °C. Crop Protection. Vol 46. Pp 57-62. ISSN 0261-2194. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.013.

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. La especie de hongo causante de la enfermedad raíz corchosa y rosada en tomate en el Valle de Culiacán Sinaloa es *Setophoma terrestris.*
2. La incidencia de raíz corchosa y rosada en los campos agrícolas de tomate en el Valle de Culiacán osciló entre 10 y 20%.
3. A las 24 hdi el hongo comenzó a colonizar la epidermis de la raíz, diseminándose el día 4 y 9 ddi, al día 17 se observarón algunas estructuras presuntivamente y coloración rosada en las células de la raíz, finalmente, se observó la colonización a ~~o~~ total del patógeno al día 33 ddi en las plantas de tomate.
4. La variedad de tomate más susceptible en el estudio fue 8444. Por otra parte, los portainjertos de tomate TOP 2024, Aorta, fueron los que presentaron la menor severidad de la enfermedad en la cepa altamente virulenta y poca virulencia, respectivamente. Multifort mostraron mayor tolerancia a la enfermedad, obsevándose lesiones más pequeñas comparadas con las que presentaron los portainjertos DR0141TX y TOP 2010.