

## *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México

### *Fusarium mexicanum* Causal Agent of Mango Malformation in Jalisco, Mexico

**Isaí Betancourt Resendes**, Laboratorio de Patología Vegetal (LabPV), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), IIAF, km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880, México; **José Joaquín Velázquez Monreal**, Campo Experimental Tecomán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km. 35 Carr. Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, CP 28100, México; **Juan Carlos Montero Castro**, Facultad de Biología, UMSNH, Cd. Universitaria, Morelia, Michoacán, CP 58060, México; **Sylvia Patricia Fernández Pavía**, LabPV, UMSNH; **Héctor Lozoya Saldaña**, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México; **Gerardo Rodríguez Alvarado\***, LabPV, UMSNH. Correspondencia: \*gra.labpv@gmail.com

(Recibido: Febrero 08, 2012 Aceptado: Mayo 25, 2012)

Betancourt Resendes, I., Velázquez Monreal, J. J., Montero Castro, J. C., Fernández Pavía, S. P., Lozoya Saldaña, H. y Rodríguez Alvarado, G. 2012. *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México. Revista Mexicana de Fitopatología 30:115-127.

**Resumen.** La malformación es una de las enfermedades más importantes del mango en el ámbito mundial. Varias especies de *Fusarium* han sido identificadas como agentes causales de esta enfermedad. Recientemente, una nueva especie, *F. mexicanum*, fue descrita causando malformación en huertas de mango de la región centro occidente de México; sin embargo, esta especie no ha sido detectada en áreas productoras del Golfo de México. Durante los últimos años, se ha presentado un incremento en las huertas de mango que presentan malformación en Jalisco, un estado localizado al norte del área donde *F. mexicanum* ha sido detectado. El objetivo de este trabajo fue identificar el patógeno causante de la malformación floral y vegetativa en Jalisco. Análisis morfológico y genético de los genes  $\beta$  tubulina, EF-1 $\alpha$ , e histona H3, mostró que todos los aislados estudiados fueron *F. mexicanum*. Se confirmó que este patógeno es la especie principal causante de la malformación del mango en los estados localizados en la región del Pacífico central. Análisis filogenéticos mostraron que *F. mexicanum* pudiera estar presente como poblaciones clonales cuya dispersión pudo haber ocurrido por medio de la comercialización de plantas de vivero contaminadas. *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum* y tipo *F. subglutinans*, especies causantes de la malformación en otros países, no fueron detectadas en este estudio.

Palabras clave adicionales: cultivos tropicales,

**Abstract.** Malformation is one of the most important diseases of mango worldwide. Several *Fusarium* species have been identified as causal agents of this disease. Recently, a new species, *F. mexicanum*, was described causing malformation in mango orchards located in the central western region of Mexico; however, it was not detected in producing areas along the Gulf of Mexico. During the last years, there has been an increase in mango orchards presenting malformation in Jalisco, a state located north of the area where *F. mexicanum* has been detected. The objective of this work was to identify the pathogen causing floral and vegetative malformation in Jalisco. Morphological and genetic analyses of the genes  $\beta$  tubulin, EF-1 $\alpha$ , and histone H3, indicated that all the isolates studied were *F. mexicanum*. This pathogen is confirmed as the main species causing mango malformation in those states located along the central Pacific region. Phylogenetic analysis showed that *F. mexicanum* may be present as clonal populations whose dispersal could have occurred through commercialization of contaminated plants from nurseries. *F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum* and *F. subglutinans* type, species causing malformation in other countries, were not detected in this study.

Additional Keywords: fruit crops, fungal diseases, *M. indica*

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the main fruit crops in Mexico. The production in 2011 was 1,536,654.28 t of fruit. In Mexico, Guerrero was the major producer in 2011, with 329,939 t. The states of Chiapas, Michoacan, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa and Veracruz, obtain each more than 100,000 t per year. The mango cultivated surface in Jalisco is 6,165 ha, which generated 56,552 t during 2011 (SIAP,

enfermedades fungosas, *M. indica*.

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los principales cultivos frutícolas en México. La producción en 2011 fue de 1,536,654.28 t de fruta. En México, Guerrero fue el mayor productor en el 2011, con 329,939 t. Los estados de Chiapas, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz, obtienen cada uno más de 100,000 t por año. La superficie cultivada de mango en Jalisco es de 6,165 ha, las cuales generaron 56,552 t durante el 2011 (SIAP, 2013).

La enfermedad malformación ocurre en la mayoría de las áreas productoras de mango y es considerada como la enfermedad más importante de este cultivo en el ámbito mundial (Kumar y Beniwal, 1992; Ploetz, 2007). Los síntomas característicos de la enfermedad incluyen la malformación de tejido floral y vegetativo. Los brotes malformados de las yemas apical y laterales presentan entrenudos acortados, y hojas pequeñas, quebradizas y angostas. Las inflorescencias malformadas presentan ejes primarios y secundarios muy ramificados, acortados y engrosados. El número de flores se incrementa dramáticamente, y son más grandes de lo normal. La malformación floral incrementa el número de flores masculinas, y las flores hermafroditas son estériles, o si son fertilizadas, posteriormente son abortadas (Ploetz, 2003).

Investigadores en India llevaron a cabo los postulados de Koch hace más de cuarenta años, demostrando que un hongo causaba la malformación del mango. El patógeno causante de ambas formas de malformación, floral y vegetativa, fue inicialmente identificado como *F. moniliforme* (Syn. *F. verticillioides*) Sheld. (Summanwar *et al.*, 1966; Varma *et al.*, 1974), posteriormente se le denominó *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenweb. y Reinking; y finalmente *F. subglutinans* (Wollenweb. and Reinking) Nelson, Toussoun and Marasas (Ploetz y Freeman, 2009). Estudios en otras regiones productoras de mango confirmaron a un tipo de *F. subglutinans* como el agente causal de la malformación en Egipto (Ibrahim *et al.*, 1975), E.E.U.U. (Ploetz y Gregory, 1993), Israel (Freeman *et al.*, 1999) y África del Sur (Manicom, 1989).

Britz *et al.* (2002) analizaron la morfología de cepas de *Fusarium* de árboles malformados en varias áreas productoras en el mundo, y determinaron la existencia de tres grupos diferentes. Información adicional de las secuencias de los genes histona H3 y  $\beta$ -tubulina para dos de esos grupos, indicaron que eran filogenéticamente distintos (Steenkamp *et al.*, 2000). En base a los datos de morfología y filogenia, Britz *et al.* (2002) establecieron dos especies nuevas para los aislados de *Fusarium* asociados con la malformación del mango. La especie de 29 cepas de Egipto, Florida, Israel, Malasia y África del Sur correspondía a *F. mangiferae* Britz, Wingfield y Marasas. Este grupo de cepas es conspecífico con aislados que habían demostrado causar la malformación del mango (Steenkamp *et al.*, 2000). La especie *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas y Wingfield fue establecida inicialmente para los aislados asociados con la malformación del mango en África del Sur. Posteriormente, se demostró que *F. sterilihyphosum* estaba presente en Brasil

(2013).

The disease malformation occurs in most mango producing areas and it is considered the most important disease of this crop worldwide (Kumar and Beniwal, 1992; Ploetz, 2007). Characteristic symptoms of the disease include malformation on vegetative and floral tissues. Malformed shoots from apical or lateral buds present shortened internodes, brittle, dwarfed and narrow leaves. Malformed inflorescences present highly branched, shortened and thickened primary and secondary axes. The number of flowers increases dramatically, and they are larger than normal. Floral malformation increases the number of male flowers, and the hermaphrodite flowers are either sterile or, if fertilized, eventually aborted (Ploetz, 2003).

Researchers in India carried out Koch's postulates more than forty years ago showing that a fungus caused malformation in mango. The pathogen causing both forms of malformation, floral and vegetative, was initially identified as *F. moniliforme* (Syn. *F. verticillioides*) Sheld. (Summanwar *et al.*, 1966; Varma *et al.*, 1974), later as *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenweb. and Reinking; and *F. subglutinans* (Wollenweb. and Reinking) Nelson, Toussoun and Marasas (Ploetz and Freeman, 2009). Studies in other mango growing regions confirmed *F. subglutinans* type as the causal agent of malformation in Egypt (Ibrahim *et al.*, 1975), USA (Ploetz and Gregory, 1993), Israel (Freeman *et al.*, 1999), and South Africa (Manicom, 1989).

Britz *et al.* (2002) analyzed the morphology of *Fusarium* strains from malformed mango trees in several producing areas in the world, and determined the existence of three different groups. Additional information on the histone H3 and  $\beta$ -tubulin gene sequences for two of those groups indicated that they were phylogenetically distinct (Steenkamp *et al.*, 2000). Based on morphological and phylogenetic data, Britz *et al.* (2002) established two new species for *Fusarium* isolates associated with mango malformation. The species *F. mangiferae* Britz, Wingfield and Marasas corresponded to 29 strains from Egypt, Florida, Israel, Malaysia, and South Africa. This group of strains is conspecific with isolates that had been proven to cause malformation in mango (Steenkamp *et al.*, 2000). The species *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas and Wingfield was established initially for isolates associated with mango malformation in South Africa. Later, it was shown that *F. sterilihyphosum* was present in Brazil (Zheng and Ploetz, 2002). An additional morphologically different group was present in Malaysia; however, there is no phylogenetic and pathogenicity information for this group (Britz *et al.*, 2002). In China, *F. proliferatum* has been detected causing mango malformation (Zhan *et al.*, 2010). Lately, *F. mangiferae* has also been reported in China (Zhan *et al.*, 2012) and Spain (Crespo *et al.*, 2012). Additionally, a new lineage of isolates named *F. tupaense* has been reported causing mango malformation in Brazil and Senegal (Lima *et al.*, 2009, 2012; Senghor *et al.*, 2012). Genetic analysis using AFLPs and vegetative compatibility groups of isolates obtained in several mango growing areas in Brazil, detected the

(Zheng y Ploetz, 2002). Un grupo adicional morfológicamente diferente estaba presente en Malasia; sin embargo, no hay información filogenética ni de patogenicidad para este grupo (Britz *et al.*, 2002). En China, *F. proliferatum* ha sido detectado causando malformación del mango (Zhan *et al.*, 2010). Últimamente, *F. mangiferae* también ha sido reportado en China (Zhan *et al.*, 2012) y España (Crespo *et al.*, 2012). Adicionalmente, un linaje llamado *F. tupaense* ha sido reportado causando malformación del mango en Brasil y Senegal (Lima *et al.*, 2009, 2012; Senghor *et al.*, 2012). Análisis genético usando AFLPs y grupos de compatibilidad vegetativa de los aislados obtenidos en varias áreas productoras de mango en Brasil, detectaron la presencia de seis grupos genéticos, indicando una población diversa, genéticamente y geográficamente, la cual podría estarse reproduciendo clonalmente (Lima *et al.*, 2009). Aunque hay numerosos estudios sobre esta enfermedad, aun se carece de información sobre la morfología, compatibilidad sexual, patogenicidad y toxigenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas con la malformación del mango (Marasas *et al.*, 2006).

La malformación del mango también es un problema en huertas de mango en México; sin embargo, en los estados de Guerrero y Michoacán causa los daños más severos (Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Mora-Aguilera *et al.*, 2003). En México, *F. oxysporum* ha sido reportado como el agente causal de la malformación de mango en Michoacán y Morelos, y *F. subglutinans* en Guerrero y Michoacán (Díaz y Romero-Cova, 1980; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Recientemente, un taxón nuevo de *Fusarium* causando malformación del mango fue detectado en Colima, Guerrero, Michoacán y Morelos, México (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010). Este taxón es similar morfológicamente a *F. sterilihyphosum*; sin embargo, es filogenéticamente distinto de cualquier otro taxón de *Fusarium* descrito previamente causando la malformación del mango. El nombre de *F. mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz y O'Donnell, sp. nov., ha sido asignado a este taxón nuevo (Otero-Colina *et al.*, 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2013). Aun cuando se han realizado estudios sobre manejo integrado de esta enfermedad en México (Vega-Piña *et al.*, 2004), continúa causando pérdidas económicas en las diferentes áreas productivas del país. En años recientes, ha habido un incremento en el número de árboles de mango afectados por esta enfermedad en varias áreas productoras en Jalisco. Determinar si *F. mexicanum* tiene una distribución más amplia en México que lo reportado previamente (Otero-Colina *et al.*, 2010), y si otros taxones de *Fusarium* están involucrados con la malformación del mango en más áreas productoras, es importante para entender mejor a estos patógenos y los mecanismos por los cuales son diseminados. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar las especies de *Fusarium* causando malformación del mango en huertos comerciales en Jalisco, un estado ubicado en la región

presence of six genetic groups, indicating a diverse population, genetically and geographically, which could be reproducing clonally (Lima *et al.*, 2009). Although, there have been numerous studies on this disease, there is still lack of information on morphology, sexual compatibility, pathogenicity and toxigenicity of the *Fusarium* species associated with mango malformation (Marasas *et al.*, 2006).

Mango malformation is also a problem in mango orchards throughout Mexico; however, in the states of Guerrero and Michoacán causes the most severe damage (Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Mora-Aguilera *et al.*, 2003). In Mexico, *F. oxysporum* has been reported as the causal agent of mango malformation in Michoacán and Morelos, and *F. subglutinans* in Guerrero and Michoacán (Díaz and Romero-Cova, 1980; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Recently, a new taxon of *Fusarium* causing mango malformation was detected in Colima, Guerrero, Michoacán and Morelos, Mexico (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010). This taxon is morphologically similar to *F. sterilihyphosum*; however, it is phylogenetically distinct from any other *Fusarium* taxon described previously causing mango malformation. The name *F. mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz and O'Donnell, sp. nov. has been assigned to this new taxon (Otero-Colina *et al.*, 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2013). Although studies on integrated management have been carried out on this disease in Mexico (Vega-Piña *et al.*, 2004), it continues to cause economic losses in the several productive regions of the country. In recent years, there has been an increase in the number of mango trees affected by this disease in several producing areas in Jalisco. Determining if *F. mexicanum* has a wider distribution in Mexico than that previously reported (Otero-Colina *et al.*, 2010), and if other fusaria taxa are involved with mango malformation in more producing areas, is important to understand better these pathogens and the manners in which they are disseminated. Therefore, the objective of this research was to identify the species of *Fusarium* causing mango malformation in commercial orchards in Jalisco, a state located in the central western mango producing area in Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

***Fusarium* isolates.** Fifteen samples of floral and vegetative malformed tissue from five mango cv. Tommy Atkins trees, were collected in an orchard located in La Huerta County, Jalisco, during May of 2007 (19.485° - 104.643333°). Three different malformed panicles were sampled per each tree. The disease incidence in the orchard was approximately 10 %. The samples were placed in paper bags in a styrofoam box and were sent overnight to the Plant Pathology Laboratory (UMSNH) in Morelia, Michoacán. In the laboratory, plant samples were washed with detergent and rinsed with tap water to remove soil and insects. Small sections of malformed tissue were cut, surface disinfected in 10 % sodium hypochlorite (Clorox U.S.A.) for 5 min, rinsed three times with sterile distilled water. Excess water was



productora de mango del centro occidente en México.

## MATERIALES Y METODOS

**Aislados de *Fusarium*.** Quince muestras de tejido malformado floral y vegetativo de cinco árboles de mango del cultivar Tommy Atkins, fueron colectados en una huerta localizada en el municipio de La Huerta, Jalisco, durante mayo del 2007 (19.485°, -104.643333°). Tres paniculas malformadas fueron muestreadas por cada árbol. La incidencia de la enfermedad en la huerta fue aproximadamente del 10 %. Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel en una hielera de unicel y fueron enviadas durante la noche al Laboratorio de Patología Vegetal (UMSNH) en Morelia, Michoacán. En el laboratorio, las muestras vegetales fueron lavadas con detergente y enjuagadas con agua de la llave para remover insectos y suelo. Secciones pequeñas de tejido malformado fueron cortadas, desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 10 % (Clorox, E.E.U.U.) por 5 min y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. El exceso de agua fue removido con toallas de papel estéril. Diez explantos de tejido por muestra fueron sembrados en cajas con PDA fresco a la mitad de la concentración (20 g agar, y 10 g dextrosa, disueltos en el líquido obtenido de la cocción de 125 g de papas blancas, y aforado a un litro con agua destilada) e incubados a 25 °C. El medio PDA contenía Ampicilina 0.27 g/L y Rifampicina 0.01 g/L. Puntas de hifas que emergieron de los explantos y crecieron en el medio, fueron transferidas a cajas que contenían medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) y dos pedazos de papel filtro estéril, de 0.5 cm<sup>2</sup> (Whatman, E.E.U.U.) para inducir la esporulación (Leslie y Summerell, 2006).

**Cultivos monospóricos y su preservación.** Se obtuvieron cultivos monospóricos para todos los aislados que crecieron en medio SNA. Dos discos de 0.5 mm<sup>2</sup> de medio y micelio de cada uno de los aislados fueron colocados en tubos de vidrio de 10 mL que contenían 3 mL de agua destilada estéril. Los tubos fueron agitados brevemente para separar los conidios del micelio, se tomaron 30 µl de una suspensión de conidios y se dispersó en cajas que contenían agar agua al 2 %. Las cajas fueron incubadas a 25 °C en la oscuridad por 20 h. Los conidios germinados fueron observados con un microscopio estereoscópico, y se transfirieron individualmente a cajas con SNA y papel estéril, e incubadas bajo luz fluorescente fría y blanca con periodos de 12 h luz y oscuridad a 25 °C. Una vez que los cultivos cubrieron la mayor parte del medio en la caja, se agregaron 3 mL de glicerol estéril al 25 % para remover los conidios del micelio. Un mL de la suspensión de conidios se transfirió a cada uno de tres tubos criogénicos de 2 mL y se almacenaron a -70 °C. Todos los experimentos se empezaron usando alícuotas de las suspensiones de conidios almacenados en glicerol de cada aislado. Los cultivos fueron depositados en la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Vegetal, UMSNH.

**Caracterización cultural y morfológica.** Los aislados fueron incubados en cajas con PDA fresco (20 g agar y 20 g dextrosa, disueltos en el líquido obtenido de la cocción de 125 g de papas blancas, aforado a un litro con

removed by blotting with sterile paper towels. Ten tissue explants per sample were then plated on fresh half strength PDA (20 g agar, 10 g dextrose and the broth from 125 g white potatoes made up to 1 L with distilled water) plates and incubated at 25 °C overnight. PDA medium contained also Ampicillin 0.27 g/L and Rifampicin 0.01 g/L. Tip hyphae emerging from the explants and growing on the medium were transferred to plates containing Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) media and two sterile, 0.5 cm<sup>2</sup> pieces of filter paper (Whatman®, USA) to produce spores (Leslie and Summerell, 2006).

### Monosporic cultures and preservation.

Monosporic cultures were obtained from all of the isolates growing on SNA. Two 0.5 mm<sup>2</sup> blocks of media and mycelium from each isolate were placed in 10 mL glass tubes containing 3 mL of sterile distilled water. Tubes were briefly shaken to dislodge conidia from the mycelia, 30 µl of a suspension of conidia was taken and spread on plates containing 2 % water agar. Plates were incubated at 25 °C in the dark for 20 h. Germinated conidia were observed with a stereoscopic microscope, transferred individually to plates with SNA plus sterile paper and incubated under fluorescent cool-white and black lights with alternating 12 h periods of light and darkness at 25 °C. Once the cultures covered most of the plate medium, 3 mL of 25 % sterile glycerol were added to the plate and used to wash off conidia from the mycelia. One ml of conidia suspension was transferred to each of three cryogenic 2 mL tubes and stored at -70 °C. All experiments were started using aliquots of stored glycerol suspensions of conidia from each isolate. Cultures were deposited at the Fungal Collection, Plant Pathology Laboratory, UMSNH.

### Cultural and morphological characterization.

Isolates were incubated on fresh PDA (20 g agar, 20 g dextrose and the broth from 250 g white potatoes made up to 1 L with distilled water) and CLA (carnation leaf agar) (Leslie and Summerell, 2006) plates to stimulate culture and conidial development. Cultures were incubated under light conditions as mentioned above. After 10 to 14 d of incubation the following morphological characters were analyzed: color, type of mycelia and shape, size, and number of septa of macroconidia and microconidia, presence of mono and/or polyphialides, presence of chlamydoconidia and sterile coiled hyphae. Twenty five measurements were made of macroconidia and microconidia morphological characters range and mean values were calculated (Leslie and Summerell, 2006).

**Pathogenicity test.** Isolates MXJAL-2, MXJAL-8 and MXJAL-11 were grown on CLA plates under white and black light at 25 °C for 15 d. Conidia were harvested with sterile water and diluted to 2 x 10<sup>7</sup> conidia per mL. The conidial suspension was used to inoculate apical and lateral dormant buds of two year grafted mango plants cv. Haden kept in pots of 50 cm of diameter, in a shade house. Inoculations of conidial suspensions were carried out according to Freeman *et al.* (1999).

**DNA isolation.** DNA was isolated using a solvent free extraction method developed by Mahuku (2004) with

agua destilada) y en medio CLA (hojas de clave en agar agua al 2 %) (Leslie and Summerell, 2006) para estimular el desarrollo de los cultivos y los conidios. Los cultivos fueron incubados bajo las condiciones de luz mencionadas anteriormente. Después de 10 a 14 d de incubación los siguientes caracteres morfológicos fueron analizados: color, tipo de micelio, forma y tamaño, y número de septos de los macroconidios y microconidios, presencia de mono y/o polifialides, presencia de clamidosporas e hifas enrolladas estériles. Se tomaron mediciones de los caracteres morfológicos de 25 macroconidios y 25 microconidios, calculando rangos y valores de medias (Leslie and Summerell, 2006).

**Pruebas de patogenicidad.** Los aislados MXJAL-2, MXJAL-8 y MXJAL-11 fueron crecidos en cajas con CLA bajo luz blanca y negra a 25 °C por 15 d. Los conidios fueron colectados con agua estéril y diluidos a  $2 \times 10^7$  conidios por mL. La suspensión conidial fue usada para inocular yemas apicales y laterales en dormancia, de plantas de mango injertadas de dos años de edad, cultivar Haden, mantenidas en macetas de 50 cm de diámetro, en una área sombreada. Las inoculaciones de las suspensiones de conidios se llevaron a cabo de acuerdo a Freeman *et al.* (1999).

**Obtención de ADN.** ADN fue obtenido usando un método de extracción sin usar solventes desarrollado por Mahuku (2004), con modificaciones. Quince  $\mu$ l de una suspensión de conidios en glicerol al 25 %, fueron inoculados en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de medio mínimo (Leslie and Summerell, 2006). Los cultivos fueron incubados a 25 °C por 10 d para obtener micelio. Los cultivos fueron filtrados a través de tela Miracloth (Calbiochem, E.E.U.U.) estéril, el micelio se enjuagó con 200 mL de agua destilada estéril, se drenó y dejó secar toda la noche a 4 °C. El micelio seco se molió en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se transfirió a tubos de 1.7 mL, se almacenó a -20 °C hasta que se procesó. Quinientos  $\mu$ l de buffer de extracción TES (Tris-HCl 0.2 M [pH 8], EDTA 10 mM [pH 8], NaCl 0.5 M, SDS 1 %) y 1.25  $\mu$ l de Proteinasa K (200 mg/ml) (Sigma, E.E.U.U.) se agregaron a cada tubo, se agitaron en un Vortex por 30 seg y se incubaron en un baño de agua a 65 °C por 30 min. Para precipitar las proteínas se agregaron 250  $\mu$ l de acetato de amonio a cada tubo, se incubaron en hielo por 10 min, y se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf, E.E.U.U.) a velocidad máxima, a 4 °C por 15 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, los ácidos nucleicos fueron precipitados agregando un volumen de isopropanol e incubados toda la noche a -20 °C. Los tubos fueron centrifugados como se mencionó, las pastillas fueron lavadas con 800  $\mu$ l de etanol frío al 70 % y se secaron. Para remover los polisacáridos presentes en las muestras, el ADN fue eluido dos veces con extracciones repetidas usando 250  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8], EDTA 1 mM), cada vez se centrifugó a la velocidad máxima por 15 min para evitar los polisacáridos que estaban en el fondo del tubo. La solución de ADN fue transferida a un tubo nuevo que se mantuvo en hielo. Cinco  $\mu$ l de RNasa A (20 mg/mL) (Sigma, E.E.U.U.) se agregaron a la solución de ADN y se incubó a 37 °C por 60 min. El ADN se recuperó como se describió usando acetato de amonio e

modificaciones. Fifteen  $\mu$ l of a conidial suspension in 25 % glycerol, was inoculated into 250 mL flask containing 100 mL of minimal media (Leslie and Summerell, 2006). Cultures were incubated at 25 °C for 10 d to obtain a mycelial mat. Cultures were filtered through sterile Miracloth (USA), rinsed with 200 mL of sterile distilled water, drained and let dry overnight at 4 °C. Dried mycelia was ground in a sterile mortar with liquid nitrogen, transferred to 1.7 mL tubes, and stored at -20 °C until processed. Five hundred  $\mu$ l of TES extraction buffer (0.2 M Tris-HCl [pH 8], 10 mM EDTA [pH 8], 0.5 M NaCl, 1 % SDS) and 1.25  $\mu$ l of Proteinase K (200 mg/ml) (Sigma®, USA) were added to each tube, Vortex for 30 sec, and incubated in a 65 °C water bath for 30 min. To precipitate proteins 250  $\mu$ l of 7.5 M ammonium acetate were added to each tube incubated on ice for 10 min, and spin in a microcentrifuge (Eppendorf®, USA) at maximum speed, 4 °C for 15 min. Supernatant was transferred to a new tube, and nucleic acids were precipitated by adding one volume of isopropanol and incubated overnight at -20 °C. Tubes were centrifuged as before, pellets were rinsed with 800  $\mu$ l of 70 % cold ethanol and dried out. In order to remove polysaccharides present in the samples, DNA was eluted twice with repeated extractions using 250  $\mu$ l of TE (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA), each time centrifuging at max speed for 15 min to avoid collecting pelleted polysaccharides. DNA solution was transferred to a new tube and kept on ice. Five  $\mu$ l of RNase A (20 mg/mL) (Sigma®, USA) were added to the DNA solution and incubated at 37 °C for 60 min. DNA was recovered as described above using ammonium acetate and isopropanol. DNA pellets were suspended with 50  $\mu$ l TE and kept at -20 °C.

**PCR and DNA sequencing.** Portions of the nuclear genes translation elongation factor (EF-1 $\alpha$ , 15 isolates),  $\beta$ -tubulin (6 isolates), and histone H3 (5 isolates) were PCR-amplified and sequenced for the *Fusarium* isolates as described previously (O'Donnell *et al.*, 1998). Sequence of primers for the elongation factor alpha 1 gene were EF-1 (ATGGGTAAAGGARGACAAGAC) and EF-2 (GGARGTACCAGTG/CATCATGTT) (O'Donnell *et al.*, 1998); for the  $\beta$ -tubulin were T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT) and T22 (TCTGGATGTTGTTGGAATCC) (O'Donnell *et al.*, 2000a); and for the histone H3 gene were H3-1a (ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG) and H3-1b (GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT) (Glass and Donaldson, 1995). The nucleotide sequences determined in this work were deposited in GenBank under accession numbers from JN176078 to JN176092 for the EF-1 $\alpha$  gen, from JN603664 to JN603669 for the histone H3 gen, and from JN650539 to JN650543, and KC517069 for the  $\beta$ -tubulin gen. Each PCR reaction contained 12.5  $\mu$ l of PCR Master Mix (Promega®, USA), 5  $\mu$ M of each forward and reverse primers, 5  $\mu$ l of template DNA (10 % dilution) and deionized water to 25  $\mu$ l of final volume. PCR conditions in the Thermocycler (Eppendorf®, Mastercycler Gradient, USA) were an initial denaturation cycle at 95 °C for 4 min followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. A final elongation step at 72 °C for 10 min

isopropanol. Las pastillas de ADN fueron resuspendidas con 50  $\mu$ l de TE y se almacenaron a -20 °C.

**PCR y secuenciación del ADN.** Porciones de los genes nucleares factor de elongación de la traducción (EF-1 $\alpha$ , 15 aislados),  $\beta$ -tubulina (6 aislados), e histona H3 (5 aislados), fueron amplificadas por PCR y secuenciadas, para los aislados de *Fusarium* como se describió previamente (O'Donnell *et al.*, 1998). Las secuencias de los oligonucleótidos del gen factor de elongación 1 alfa fueron EF-1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) y EF-2 (GGAGTACCAGTG/CATCATGTT) (O'Donnell *et al.*, 1998); para  $\beta$ -tubulina fueron T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT) y T2 (TCTGGATGTTGTTGGAATCC) (O'Donnell *et al.*, 2000a); y para el gen histona H3 fueron H3-1a (ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG) y H3-1b (GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT) (Glass and Donaldson, 1995). Las secuencias de nucleótidos que se obtuvieron en este trabajo fueron depositadas en GenBank con los números de accesión de JN176078 a JN176092 para el gen EF-1 $\alpha$ , de JN603664 a JN603669 para el gen histona H3, y de JN650539 a JN650543, y KC517069 para el gen  $\beta$ -tubulina. Cada reacción de PCR contenía 12.5  $\mu$ l de PCR Master Mix (Promega®, E.E.U.U.), 5  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos, 5  $\mu$ l de ADN (dilución al 10 %) y agua desionizada a un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de PCR en el termociclador (Eppendorf, Mastercycler Gradient, E.E.U.U.) fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 min seguido por 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min. Un paso final de elongación a 72 °C por 10 min finalizó las reacciones. El ADN amplificado en las reacciones de PCR fue purificado usando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega, E.E.U.U.). Los productos de las amplificaciones fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % a 50 Volts por 90 min, teñidos con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/mL y fotografiados con un sistema Kodak DAS 290 (Eastman Kodak, E.E.U.U.). Las secuencias del ADN amplificado fueron obtenidas a través de una compañía comercial (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

**Blast y análisis filogenético.** Las secuencias consenso para todas las regiones amplificadas de cada aislado fueron obtenidas usando Pregap y Gap (Staden Package, 2002). Las secuencias fueron editadas manualmente en Gap y alineadas con otras secuencias de *Fusarium* usando el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), y posteriormente usadas en el programa BLASTN 2.2.25+ (Zhang *et al.*, 2000) para determinar la identidad de los taxones en base a la similitud entre las secuencias, expresado como porcentaje de identidad de las secuencias.

Para confirmar los resultados del análisis Blast, se llevó a cabo un estudio filogenético usando las secuencias de los genes EF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Solamente se utilizaron secuencias de esos genes para este estudio porque los datos preliminares mostraron una estructura filogenética adecuada para el objetivo de esta investigación (Cuadro 1). Además, las pocas secuencias de histona obtenidas mostraron bajo polimorfismo lo cual no habría producido un cambio sustancial en los resultados presentados en este

ended the reactions. DNA amplified in PCR reactions was purified using a commercial kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega®, USA). DNA amplification products were analyzed in 1.5 % agarose gels at 50 Volts for 90 min, stained with 0.5  $\mu$ g /mL ethidium bromide and documented with a Kodak DAS 290 (Eastman Kodak®, USA) system. Sequences of the amplified DNA were obtained through a commercial company (Macrogen, Seoul, Korea).

**Blast and phylogenetic analysis.** Consensus sequences for all amplified regions from each isolate were obtained using Pregap and Gap (Staden Package, 2002). Sequences were edited manually in Gap and align with other *Fusarium* sequences using the Mega 5.0 program (Tamura *et al.*, 2011), and then used in the BLASTN 2.2.25+ program (Zhang *et al.*, 2000) to determine taxon identity based on similarity between sequences expressed as percent sequence identity.

In order to confirm the results of the Blast analysis, a phylogenetic study was carried out using EF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin gene sequences. Only sequences for these genes were used for this study because preliminary data showed an adequate phylogenetic structure for the objective of this research (Table 1). Furthermore, the few obtained histone sequences showed low polymorphism which would have had no substantial change in the results presented in this study.

Sequences of other fusaria used in several studies were included as outgroup (Table 1). Sequences alignments were obtained with BIOEDIT (Hall, 2011). Regions were assembled into one matrix and then analyzed with maximum parsimony, bootstrap (PAUP\* version 4.0b; Swofford, 2002) and Bayesian phylogenetic analysis (MrBayes 3.2; Ronquist *et al.*, 2012). Maximum parsimony analysis was carried out with three thousand random addition replicates. Clade stability was assessed by nonparametric bootstrap, with 500 replicates using the heuristic. jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) was employed to select among alternative models of evolution. Bayesian phylogenetic analysis was performed with seven million generations. The branch lengths were calculated as the average rates of change at each branch of the largest posterior probability trees.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Cultural and morphological analysis.** Three types of fungal colonies were observed growing from the explants on the culture plates two days after planting. One type presented colonies growing on top of the explants which typically corresponded to contaminant fungus such as *Aspergillus* and *Penicillium*. A second type corresponded to a fast growing fungus with white mycelium and absent reproductive structures. The third type of colonies presented long hyphae with aerial conidiophores or sporodochia. These hyphae produced abundant macroconidia and micronidia on short phialides typical of the genus *Fusarium*. This is an important characteristic to distinguish *Fusarium* strains associated with mango malformation during isolation procedures (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008).



Cuadro 1. Secuencias adicionales obtenidas del GenBank (NCBI) usadas para el análisis filogenético.  
Table 1. Sequences obtained from GenBank (NCBI) used for the phylogenetic analysis.

| <i>Fusarium</i>           | Host                         | Origin       | Strain     | Elongation factor | β-Tubulin |
|---------------------------|------------------------------|--------------|------------|-------------------|-----------|
| <i>F. oxysporum</i>       | <i>Pseudotsuga menziesii</i> | U.S.A.       | NRRL 22902 | AF160312          | U34424    |
| <i>F. denticulatum</i>    | <i>Ipomoea batatas</i>       | U.S.A.       | NRRL 25302 | AF160269          | U61550    |
| <i>F. magniferae</i>      | <i>Mangifera indica</i>      | India        | NRRL 25226 | AF160281          | U61561    |
| <i>F. sterilihyphosum</i> | <i>M. indica</i>             | Brazil       | CML 283    | DQ452858          | DQ445780  |
| <i>F. sterilihyphosum</i> | <i>M. indica</i>             | South Africa | NRRL 25623 | AF160300          | AF160316  |
|                           |                              |              | MRC 2802   |                   | AF160344  |
| <i>F. sterilihyphosum</i> | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53989 | GU737267          | GU737479  |
|                           |                              |              | CML 280    |                   |           |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | CML 345    | DQ452861          | DQ445783  |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | CML 389    | DQ452860          | DQ445782  |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53986 | GU737410          | GU737302  |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53995 | GU737411          | GU737303  |
|                           |                              |              | CML 386    |                   |           |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53996 | GU737412          | GU737304  |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | CML 262    | DQ452859          | DQ445781  |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53990 | GU737402          | GU737294  |
|                           |                              |              | CML 281    |                   |           |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53992 | GU737403          | GU737295  |
|                           |                              |              | CML 350    |                   |           |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>M. indica</i>             | Brazil       | NRRL 53993 | GU737408          | GU737300  |
|                           |                              |              | CML 383    |                   |           |
| <i>Fusarium</i> sp.       | <i>Ipomoea batatas</i>       | Peru         | NRRL 25346 | AF160296          | U61564    |
| <i>Fusarium</i> sp.       | Ornamental grass             | South Africa | NRRL 26756 | AF160307          | AF160322  |
|                           |                              |              | MRC 6747   |                   |           |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 53147 | Gu737282          | GU737494  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 53143 | GU737278          | GU737490  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 53140 | GU737275          | GU737487  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 47473 | GU737416          | GU737308  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 47478 | GU737417          | GU737309  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 47485 | GU737418          | GU737310  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 47493 | GU737419          | Gu737311  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Michoacan    | NRRL 53580 | GU737421          | GU737313  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Guerrero     | NRRL 53571 | GU737420          | GU737312  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Morelos      | NRRL 53575 | GU737286          | GU737498  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Colima       | NRRL 53150 | GU737284          | GU737536  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-1    | JN176078          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-2    | JN176079          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-3    | JN176080          |           |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-4    | JN176081          | Jn650539  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-5    | JN176082          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-6    | JN176083          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-7    | JN176084          | JN859935  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-8    | JN176085          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-10   | JN176086          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-11   | JN176087          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-13   | JN176088          | JN650540  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-14   | JN176089          | JN650541  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-17   | JN176090          | JN650542  |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-18   | JN176091          | *         |
| <i>F. mexicanum</i>       | <i>M. indica</i>             | Jalisco      | MXJAL-19   | JN176092          | JN650543  |

\* Sequences for these isolates were not obtained.

estudio.

Como grupos externos se incluyeron secuencias de *Fusarium* de otros estudios (Cuadro 1). El alineamiento de secuencias se realizó con BIOEDIT (Hall, 2011). Las secuencias de diferentes regiones fueron fusionadas en una única matriz y de esa forma evaluada con análisis filogenéticos de parsimonia, bootstrap (PAUP\* versión 4.0b; Swofford, 2002) y bayesianos (MrBayes 3.2; Ronquist *et al.*, 2012). El análisis de parsimonia máxima se realizó con 3,000 repeticiones de adición al azar. El análisis bootstrap para estimar la estabilidad de los clados fue del tipo no paramétrico, usando una búsqueda heurística de 500 réplicas. Para seleccionar el modelo de evolución molecular se empleó jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012). El análisis bayesiano se realizó con 7,000,000 generaciones. El largo de las ramas se calculó como el promedio de las tasas de cambio de cada brazo de los árboles con mayores probabilidades posteriores.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Análisis cultural y morfológico.** Tres tipos de colonias de hongos fueron observadas creciendo de los explantos en las cajas de cultivo dos días después de sembrarlas. Un tipo presentaba colonias creciendo sobre los explantos el cual correspondía típicamente a hongos contaminantes tales como *Aspergillus* y *Penicillium*. Un segundo tipo correspondía a un hongo de crecimiento rápido con micelio blanco y ausencia de estructuras reproductivas. El tercer tipo de colonias presentaba hifas largas con esporodoquios o conidióforos aéreos. Esas hifas producían abundantes macroconidios y micronidios en fialides cortas típicas del género *Fusarium*. Esta es una característica importante para distinguir cepas de *Fusarium* asociadas con la malformación del mango durante los procedimientos de aislamiento (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008). Aproximadamente el 90 % de las colonias obtenidas de los diez explantos de cada muestra fueron del tercer tipo. Un aislado de cada muestra fue seleccionado para su posterior caracterización. Cultivos monospóricos de esos aislados produjeron micelio aéreo densamente flocooso, blanco, rosado blanco a violeta blanco en PDA. Las colonias produjeron pigmentación en el medio parcialmente oscura a violeta oscuro. Las clamidosporas no fueron observadas en los medios utilizados. En CLA los macroconidios presentaron de tres a cinco células, eran fusiformes, rectos a ligeramente curvos y mostraron una longitud promedio de 46.0  $\mu\text{m}$  y un rango de 35.4 - 57.8  $\mu\text{m}$ . Los microconidios estaban en falsas cabezas en mono y polifialides, la mayoría sin septos y clavados a elipsoidales, mostraron una longitud promedio de 10.5  $\mu\text{m}$  y un rango de 7.9 - 14  $\mu\text{m}$ . Las características culturales y morfológicas concuerdan con las observadas para *F. mexicanum*, un nuevo taxón descrito causando malformación del mango en Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010). La variación detectada en *F. mexicanum* con respecto al tamaño del macroconidio (21.5 - 62 x 1.5 - 5  $\mu\text{m}$ ) dependía si el conidio era formado en conidióforos aéreos o en esporodoquios (Otero-Colina *et al.*, 2010). *F. oxysporum* o tipos de *F. subglutinans* no fueron detectados entre los

Approximately 90 % of the colonies obtained from the ten explants from each sample were of the third type. One isolate from each sample was then selected for further characterization. Monosporic cultures from these isolates produced aerial mycelia densely floccose, white, pinkish white to violet white on PDA. Colonies produced partly dark to dark violet pigmentation in the reverse. Chlamydospores were absent in all tested media. On CLA macroconidia were three to five celled, fusiform, straight or curved and showed an average length of 46.0  $\mu\text{m}$  and a range of 35.4-57.8  $\mu\text{m}$ . Microconidia were on false-heads on mono and polyphialides, mostly without septa and clavate to ellipsoidal, showed an average length of 10.5  $\mu\text{m}$  and a range of 7.9-14  $\mu\text{m}$ . The cultural and morphological characteristics were according to those observed for *F. mexicanum*, a new taxon described causing mango malformation in Michoacan (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010). The variation detected in *F. mexicanum* regarding the size of macroconidia (21.5 - 62 x 1.5 - 5  $\mu\text{m}$ ) depended if the conidia were formed on aerial conidiophores or in sporodochia (Otero-Colina *et al.*, 2010). *F. oxysporum* or *F. subglutinans* type were not detected among the isolates obtained.

Coils of sterile hyphae are produced by some of the *Fusarium* species causing mango malformation, including *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002), *F. mexicanum* from Michoacan (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008) and *Fusarium* sp. from Brazil (Lima *et al.*, 2009). However, coils of sterile hyphae were not detected in some of the isolates of *F. mexicanum* analyzed previously (Otero-Colina *et al.*, 2010). The formation of this morphological characteristic is also shown by *F. circinatum* Nirenberg and O'Donnell emend. Britz, Coutinho, Wingfield and Marasas and *F. pseudocircinatum* O'Donnell and Nirenberg (Leslie and Summerell, 2006). The fifteen isolates analyzed in this study did not show the presence of coiled hyphae on CLA. The possibility that coiled hyphae could be produced by these isolates in another media exists. Culture conditions such as light and temperature can influence the formation and variation in shape and size of morphological structures (Leslie and Summerell, 2006).

**Pathogenicity tests.** Floral mango malformation symptoms were produced after five weeks on mango plants inoculated separately with three isolates of *Fusarium* sp., MXJAL-2, MXJAL-8 and MXJAL-11 (Figure 1). Plants inoculated with MXJAL-8 showed vegetative malformation eight weeks after inoculations (Figure 1). Inoculated strains were re-isolated from malformed floral and vegetative tissues. Water-inoculated control plants did not show malformation symptoms and *Fusarium* was not isolated from those panicles (Figure 1).

**DNA analysis - Blast.** The fifteen Jalisco isolates were divided into two groups based mainly on the sequences obtained for the EF-1 $\alpha$  gen, presenting different bases in three positions. The sequence from each group showed 100 % similarities to sequences from diverse *F. mexicanum* isolates obtained in the states of Michoacan and Morelos, Mexico (Otero-Colina *et al.*, 2010). Good quality sequences for the  $\beta$ -tubulin presented 100 % similarity with sequences



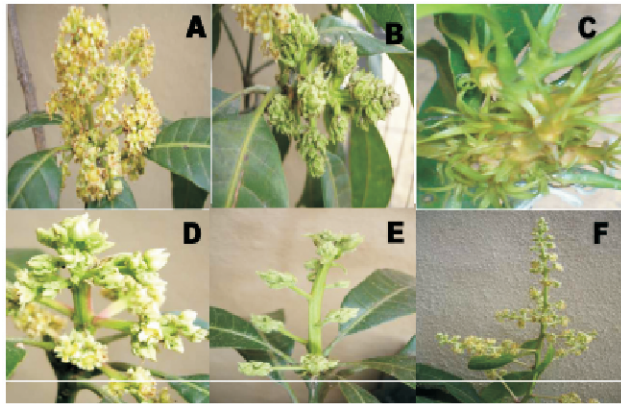


Figura 1. Síntomas inducidos en plantas de mango por aislados de *Fusarium* obtenidos de árboles de mango malformados en Jalisco. **A, B.** Malformación floral, MXJAL-2; **C.** Malformación vegetativa; **D.** Malformación floral, MXJA-8; **E.** Malformación floral, MXJAL-11; **F.** Planta control.

Figure 1. Symptoms induced on mango plants by *Fusarium* isolates obtained from malformed mango trees in Jalisco. **A, B.** Floral malformation, MXJAL-2; **C.** Vegetative malformation, MXJAL-8; **D.** Floral malformation, MXJAL-8; **E.** Floral malformation, MXJAL-11; **F.** Control plant.

aislados obtenidos.

Las hifas enrolladas estériles son producidas por algunas de las especies de *Fusarium* que causan la malformación del mango, incluyendo a *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002), *F. mexicanum* de Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008) y *Fusarium* sp. de Brasil (Lima *et al.*, 2009). Sin embargo, las hifas enrolladas estériles no fueron detectadas en algunos de los aislados de *F. mexicanum* analizados previamente (Otero-Colina *et al.*, 2010). La formación de esta característica morfológica también es presentada por *F. circinatum* Nirenberg and O'Donnell emend. Britz, Coutinho, Wingfield and Marasas y *F. pseudocircinatum* O'Donnell and Nirenberg (Leslie and Summerell, 2006). Los quince aislados analizados en este estudio no mostraron la presencia de hifas enrolladas en CLA. Existe la posibilidad de que las hifas enrolladas pudieran ser producidas por estos aislados en otro medio. Las condiciones culturales tales como luz y temperatura pueden influir en la formación y variación en forma y tamaño de las estructuras morfológicas (Leslie and Summerell, 2006).

**Pruebas de patogenicidad.** Síntomas de malformación floral fueron producidos cinco semanas después de inocular plantas de mango separadamente con tres aislados de *Fusarium* sp., MXJAL-2, MXJAL-8 and MXJAL-11 (Figura 1). Las plantas inoculadas con MXJAL-8 mostraron malformación vegetativa ocho semanas después de las inoculaciones (Figura 1). Las cepas inoculadas fueron re-aisladas de los tejidos malformados, floral y vegetativo. Las plantas control inoculadas con agua

of several *F. mexicanum* isolates obtained in the states of Colima, Guerrero and Michoacan (Otero-Colina *et al.*, 2010). The sequences for the histone H3 region of the isolates varied in one position. Similarly to the results obtained for the elongation factor gen, all the isolates showed 100 % similarities to sequences from *F. mexicanum* isolates obtained in the state of Michoacan, Mexico (Otero-Colina *et al.*, 2010).

**Phylogenetic analysis.** The EF-1 $\alpha$  alignment was 646 bp length with six informative gaps and  $\beta$ -tubulin alignment was 513 positions length with one gap. The best-fit models of nucleotide substitution were GTR (Rodríguez *et al.*, 1990) for EF-1 $\alpha$  and HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) for  $\beta$ -tubulin. The parsimony analysis of the combined data set produced 46 most-parsimonious trees, with consistency index of 90 and retention index of 91. The parsimony strict consensus resolved 12 nodes, while the Bayesian analysis resolved two additional clades. Only those clades resolved by both tests are presented in Figure 2. All samples of fusaria isolates from Jalisco and *F. mexicanum* were resolved as a monophyletic group (96 % bootstrap, 100 % posterior probability), showing an additional structure with two clusters. Closely related to Mexican clade is NRRL 25346 *Fusarium* sp. from Peru and NRRL 26756 *Fusarium* sp. from South Africa. Another separate monophyletic group is comprised of all *Fusarium* sp. from Brazil and *F. sterilihyphosum* (100 % bootstrap, 100 % posterior probability), grouped each in their respective lineages. The groups described are united in a large clade (100 % bootstrap, 100 % posterior probability) that excludes *F. mangiferae* and other outgroups (Figure 2).

The combination of these sequences gives an acceptable resolution of relationships, as expected based on the results of other studies (O'Donnell *et al.*, 2000b; Lima *et al.*, 2009). The close relationship of fusaria isolates from Jalisco and *F. mexicanum* that has been demonstrated in cultural and morphological analysis in this study is confirmed obtaining the clade that unites them with the high values of statistical support, providing a solid evidence of their monophyly. The additional structure present in this clade does not produce exclusively clusters of fusaria isolates from Jalisco or *F. mexicanum*, so no one could argue that they are two separate species. This in turn, could indicate that recent changes are occurring in their genetic material and which eventually are spreading clonally.

This study confirmed the prevalence of *F. mexicanum* in mango producing states in central western México. It had been previously detected in Colima, Guerrero and Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010), states along the Pacific coastline, being Jalisco the next state up north. These findings suggest that *F. mexicanum* is well established in this region and it has probably being disseminated through contaminated plant material from nurseries in those states, since this species has been found on seedlings (data not shown). Mango malformation is also common in the Gulf of Mexico producing areas; however, this species has not been detected in mango orchards in that region (Otero-Colina *et al.*, 2010). As suggested above, the geographic origin of *F. mexicanum*

no mostraron síntomas de malformación y *Fusarium* no fue aislado de esas panículas (Figura 1).

**Análisis del ADN - Blast.** Los quince aislados de Jalisco fueron divididos en dos grupos en base principalmente en las secuencias obtenidas del gen EF-1 $\alpha$ , al presentar bases diferentes en tres posiciones. Las secuencias de cada grupo mostraron 100 % de similitud con secuencias de diversos aislados de *F. mexicanum* obtenidos en los estados de Michoacán y Morelos, México (Otero-Colina *et al.*, 2010). Las secuencias de buena calidad para el gen de  $\beta$ -tubulina presentaron 100 % de similitud con secuencias de varios aislados de *F. mexicanum* obtenidos en los estados de Colima, Guerrero y Michoacán (Otero-Colina *et al.*, 2010). Las secuencias para la región de histona H3 de los aislados varió en una posición. Similarmente a los resultados obtenidos para el gen factor de elongación, todos los aislados mostraron 100 % de similitud con secuencias de aislados de *F. mexicanum* obtenidos en el estado de Michoacán, México (Otero-Colina *et al.*, 2010).

**Análisis filogenético.** El alineamiento de EF-1 $\alpha$  fue de 646 posiciones con 6 gaps informativos, mientras que el de  $\beta$ -tubulina fue de 513 posiciones con un gap. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor ajustó a EF-1 $\alpha$  fue el GTR (Rodríguez *et al.*, 1990), en cambio para la  $\beta$ -tubulina ajustó mejor el HKY (Hasegawa *et al.*, 1985). El análisis de parsimonia de los datos combinados produjo 46 árboles de máxima parsimonia, con índice de consistencia de 90 y de retención de 91. El consenso estricto de estos árboles retiene 12 clados, en cambio el análisis bayesiano conserva 14 agrupamientos. En la Figura 2 se presentan las agrupaciones resueltas por ambos análisis. Todas las muestras de aislados de Jalisco y los *Fusarium mexicanum* se encontraron como un grupo monofilético (96 % bootstrap, 100 % probabilidad posterior), mostrando dos agrupamientos internos adicionales. Cercanamente relacionados al clado Mexicano están los aislados de *Fusarium sp.* NRRL 25346 del Perú y el NRRL 26756 de África del Sur. Otro grupo monofilético incluye a todos los *Fusarium sp.* de Brasil y los *F. sterilihyphosum* (100 % bootstrap, 100 % probabilidad posterior), a su vez agrupados en sus respectivos linajes. Los grupos antes mencionados conforman un gran clado que excluye a *F. mangiferae* y demás grupos externos (Figura 2).

La combinación de las secuencias brinda una resolución aceptable de las relaciones, como se esperaba con base en los resultados de otros estudios (O'Donnell *et al.*, 2000b; Lima *et al.*, 2009). Las relaciones cercanas de los aislados de *Fusarium* de Jalisco y de *F. mexicanum* que ha sido demostrada en el análisis cultural y morfológico en este estudio, es confirmada con la obtención del clado que los unen con altos valores de apoyo estadístico, proveyendo evidencia sólida de su monofilia. La estructura adicional encontrada en esta agrupación no produce agrupamientos exclusivos de los aislamientos de Jalisco o de *F. mexicanum*, por lo que no se puede argumentar que son especies diferentes. En cambio, esto podría indicar que están ocurriendo cambios recientes en el material genético, los cuales se están expandiendo de forma clonal.

Este estudio confirmó la prevalencia de *F. mexicanum* en los estados productores de mango en la

could be located in the central western region of Mexico. Other *Fusarium* species reported as causal agents of mango malformation in other countries, *F. mangiferae* (Steenkamp *et al.*, 2000) and *F. sterilihyphosum* (Zheng and Ploetz, 2002; Lima *et al.*, 2009) have not been detected in México. *F. subglutinans* (Vega-Piña and Miranda-Salcedo, 1993, Noriega-Cantú *et al.*, 1999) has been reported in the past in Mexico; however, it was not detected in this work or in previous studies (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008, Otero-Colina *et al.*, 2010). A more thorough implementation of phytosanitary measures are needed to prevent farther dissemination of this pathogen into more mango growing areas in Mexico. Due to the restrictive sampling these results may require additional future studies that include other regions, cultivars and phenologic periods.

## CONCLUSIONS

*F. mexicanum* was identified as the causal agent of mango malformation in Jalisco. Phylogenetic analysis showed that *F. mexicanum* may be present as clonal populations in mango growing areas in Mexico.

**Acknowledgment.** We are thankful to Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP, Celaya, Guanajuato) for providing sterile carnation leaves for CLA medium. This work was supported by a Grant for Basic Science Research from CONACYT, Mexico through Project No. 84578 to G. Rodríguez-Alvarado.

## LITERATURE CITED

- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO and Wingfield MJ. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia* 94:722-730.
- Crespo M, Cazorla FM, Hermoso JM, Guirado E, Maymon M, Torés JA, Freeman S., and de Vicente A. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* in Spain. *Plant Disease* 96: 286-286.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D. 2012. jModeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Díaz BV y Romero-Cova S. 1980. Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos. *Agrociencia* 39: 35-40.
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. *Phytopathology* 89:456-461.
- Glass NL and Donaldson GC. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
- Hall T. 2011. BioEdit v7.1.3. Biological sequence alignment editor for Windows. [mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html](http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html) (consulta, diciembre 2012).
- Hasegawa M, Kishino H and Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*



Figura 2. Árbol de consenso estricto a partir de 46 árboles más parsimoniosos (índice de consistencia de 90 e índice de retención de 95) obtenidos del análisis de la matriz combinada de secuencias de EF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Agrupamientos con apoyo estadístico se indican sobre el brazo el valor bootstrap y por debajo la probabilidad posterior. La longitud de ramas representan el promedio de las tasas de sustitución en cada rama de los árboles con mayor probabilidad posterior.

Figure 2. Strict consensus tree of 46 most parsimonious trees (consistency index of 90 and retention index of 95) derived from analysis of combined dataset of the translation elongation EF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin genes. Parsimony bootstrap supports are reported above and posterior probabilities below the corresponding branches. The branch lengths were calculated as the average rates of change at each branch of the largest posterior probability trees.



región centro occidente de México. Previamente, había sido detectado en Colima, Guerrero y Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010), estados situados en la costa del Pacífico, siendo Jalisco el siguiente estado hacia el norte. Estos resultados sugieren que *F. mexicanum* está bien establecido en esta región y ha sido probablemente diseminado a través de material vegetal contaminado de viveros en esos estados, ya que esta especie ha sido detectada en plántulas (datos no mostrados). La malformación del mango es también común en las áreas productoras del Golfo de México; sin embargo, esta especie no ha sido detectada en huertas de mango en esa región (Otero-Colina *et al.*, 2010). Como se sugirió, el origen geográfico de *F. mexicanum* podría estar localizado en la región centro occidente de México. Otras especies de *Fusarium* reportadas como agentes causales de la malformación del mango en otros países, *F. mangiferae* (Steenkamp *et al.*, 2000) y *F. sterilihyphosum* (Zheng and Ploetz, 2002; Lima *et al.*, 2009) no han sido detectados en México. *F. subglutinans* (Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Noriega-Cantú *et al.*, 1999) ha sido reportado en México en el pasado; sin embargo, no fue detectado en este trabajo o en estudios previos (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010). Una implementación más estricta de medidas fitosanitarias es necesaria para prevenir una mayor diseminación de este patógeno en más áreas productoras de mango en México. Debido a lo restrictivo del muestreo estos resultados pueden requerir estudios futuros que incluyan otras regiones, variedades y etapas fenológicas.

## CONCLUSIONES

*F. mexicanum* fue identificado como el agente causal de la malformación del mango en Jalisco. El análisis filogenético mostró que *F. mexicanum* pudiera estar presente como poblaciones clonales en áreas productoras de mango en México.

**Agradecimientos.** Agradecemos al Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP, Celaya, Guanajuato) el proveer hojas estériles de clavel para el medio CLA. Este trabajo fue financiado con un apoyo para Investigación en Ciencia Básica de CONACYT, México por medio del Proyecto No. 84578 a G. Rodríguez-Alvarado.

- 22:160-74.
- Ibrahim AN, Satour MM, El-Tobshy ZM and Abdel Sattar MA. 1975. Pathological and histological note on mango malformation in Egypt. *Current Science* 44:443-444.
- Kumar J and Beniwal SPS. 1992. Mango malformation. Pp: 357-393. *In: Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadhyay AN (eds.). Plant Diseases of International Importance.* Prentice Hall. New York, USA. 544p.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual.* Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388p.
- Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Campos MA and Leslie JF. 2009. A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. *Plant Pathology* 58:33-42.
- Lima, CS., Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, and Leslie JF. 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104: 1408-1419.
- Manicom BQ. 1989. Blossom malformation of mango. South African Mango Grower's Association Yearbook 10:11-12.
- Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81.
- Marasas WFO, Ploetz RC, Wingfield MJ, Wingfield BD and Steenkamp ET. 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. *Phytopathology* 96:667-672.
- Mora-Aguilera A, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera G, Sánchez-García P y Javier-Mercado J. 2003. Progreso temporal de "Escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 1-12.
- Noriega CDH. 1996. Escoba de bruja del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México.
- Noriega-Cantú DH, Téliz D, Mora-Aguilera G, Rodríguez-Alcazar J, Zavaleta-Mejía E, Otero-Colina G and Campbell CL. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, Mexico, with traditional and integrated management. *Plant Disease* 83:223-228.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95:2044-2049.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK and Casper HH. 2000a. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 97:7905-7910.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T and Cigelnik E. 2000b. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.
- Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon M, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K and Freeman S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in México, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology* 100:1176-1184.
- Ploetz RC and Gregory N. 1993. Mango malformation in Florida: Distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships within and among strains from different orchards. *Acta Horticulturae* 341:388-394.

- Ploetz RC. 2003. Diseases of Mango. Pp:327-363. In: Ploetz RC. (ed.). Diseases of Tropical Fruit Crops. CAB International. Wallingford, UK. 512p.
- Ploetz RC. 2007. Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments. Plant Disease 91:644-663.
- Ploetz RC and Freeman S. 2009. Foliar, Floral and Soilborne Diseases. Pp:231-302. In: Litz RE (ed.). The Mango, 2nd Edition: Botany, Production and Uses. CAB International. Wallingford, UK. 696p.
- Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP, Ploetz RC and Valenzuela-Vázquez M. 2008. A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacan, Mexico. Plant Pathology 57:181.
- Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Otero-Colina G, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K, Maymon M and Freeman S. 2013. Identification and characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation disease in Mexico. Acta Horticulturae. 992:377-384.
- Rodríguez F, Oliver JL, Marín A and Medina JR. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. Journal of Theoretical Biology 142:485-501.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayers DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model. Systematic Biology 61: 539-542.
- Senghor AL, Sharma K, Kumar PL, and Bandyopadhyay R. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium tuiense* in Senegal. Plant Disease 96: 1582-1582.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA). 2013. [siap.gob.mx/index](http://siap.gob.mx/index) (consulta, enero 2013).
- Staden Package. 2002. <http://staden.sourceforge.net/> (consulta, octubre 2012).
- Steenkamp ET, Britz H, Coutinho T, Wingfield B, Marasas W and Wingfield M. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. Molecular Plant Pathology 1:187-193.
- Summanwar AS, Raychaudhuri SP and Pathak SC. 1966. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. with the malformation in mango (*Mangifera indica* L.). Indian Phytopathology 19:227-228.
- Swofford DL. 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA. 144 p.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Varma A, Lele VC, Raychaudhuri SP, Ram A and Sang A. 1974. Mango malformation: A fungal disease. Journal of Phytopathology 79:254-257.
- Vega-Piña A y Miranda-Salcedo MA. 1993. Distribución, incidencia y severidad de la escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.) en el Valle de Apatzingán, Mich. Revista Mexicana de Fitopatología 11:1-4.
- Vega-Piña A, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera G, Sánchez-García P, y Otero-Colina G. 2004. Período de agobio hídrico, intensidad de poda y uso de agroquímicos en un programa de manejo integrado de escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22:61-71.
- Zhan RL, Yang SJ, Ho HH., Liu F, Zhao YL, Chang JM, and He YB. 2010. Mango malformation disease in south China caused by *Fusarium proliferatum*. Journal of Phytopathology 158: 721-725.
- Zhan RL, Yang SJ, Liu F, Zhao YL, Chang JM, and He YB. 2012. First report of *Fusarium mangiferae* causing mango malformation in China. Plant Disease 96:762.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7:203-214.
- Zheng Q and Ploetz R. 2002. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. Plant Pathology 51:208-216.