

## Caracterización de Grupos de Compatibilidad Vegetativa de *Fusarium mexicanum* Causante de la Malformación del Mango en Jalisco, México

### Vegetative Compatibility Groups Characterization of *Fusarium mexicanum* Causing Mango Malformation in Jalisco, Mexico

Gerardo Rodríguez Alvarado, Isai Betancourt Resendes, Rodrigo Rodríguez Fernández, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880, México; José Joaquín Velázquez Monreal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecomán, Colima, CP 28100, México; Sylvia Patricia Fernández Pavía, Nuria Gómez Dorantes, UMSNH, Laboratorio de Patología Vegetal. Correspondencia: gra.labpv@gmail.com

(Recibido: Octubre 05, 2012 Aceptado: Junio 06, 2013)

---

Rodríguez Alvarado, G., Betancourt Resendes, I., Rodríguez Fernández, R., Velázquez Monreal, J. J., Fernández Pavía, S. P. y Gómez Dorantes, N. 2012. Caracterización de Grupos de Compatibilidad Vegetativa de *Fusarium mexicanum* Causante de la Malformación del Mango en Jalisco, México. Revista Mexicana de Fitopatología 30:128-140.

**Resumen.** Aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de árboles de mango con la enfermedad malformación en Jalisco, fueron caracterizados de acuerdo a grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs). *F. mexicanum* ha sido detectado causando malformación del mango en varias regiones de México. Los aislados fueron cultivados en medio mínimo suplementado con clorato de potasio (KClO<sub>3</sub>), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y L-asparagina, para generar mutantes *nit*. Los mutantes son detectados como sectores de micelio resistente al clorato, incapaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno debido a mutaciones en loci asociados con la ruta metabólica del nitrato. Aislados de *F. mexicanum* generaron 239 sectores de micelio resistentes al clorato, siendo 62.3 % mutantes *nit*. La caracterización fenotípica detectó 36.91 % de mutantes *nit1*, 28.18 % de mutantes *nit3*, 19.46 % de mutantes NitM y 14.76 % de mutantes *nnu*. Pruebas de compatibilidad detectaron dos GCVs. Los aislados en un GCV de Jalisco fueron compatibles con aislados de un GCV previamente identificado de *F. mexicanum* de Michoacán. Un total de tres GCVs fueron detectados en la región Pacífico centro de México.

Palabras clave adicionales: Mutantes *nit*, heterocarión, anastomosis, GCV, frutales, enfermedades.

---

La malformación del mango es una de las enfermedades más destructivas de este cultivo (Kumar and Beniwal, 1992). La

**Abstract.** *Fusarium mexicanum* has been described as the causal agent of mango malformation in several producing areas in Mexico. Isolates of *F. mexicanum* obtained from mango trees with malformation disease in Jalisco were characterized according to vegetative compatibility groups (VCGs). Isolates were cultured on minimal medium supplemented with potassium chlorate (KClO<sub>3</sub>), NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and L-asparagine, to generate spontaneous nitrate nonutilizing (*nit*) mutants. Mutants are detected as mycelia sectors chlorate-resistant, which are not able to utilize nitrate as a nitrogen source due to mutations at loci associated with the nitrate-assimilation pathway. *F. mexicanum* isolates generated 239 chlorate-resistant sectors of mycelia, out of 62.3 % were *nit* mutants. Phenotypic characterization detected 36.91 % mutants *nit1*, 28.18 % mutants *nit3*, 19.46 % mutants NitM and 14.76 % mutants *nnu*. Compatibility pairing tests amongst the mutants detected two VCGs in isolates of *F. mexicanum* from Jalisco. Isolates in one VCG from Jalisco were compatible with isolates of a previously identified VCG of *F. mexicanum* from Michoacan. A total of three VCGs were detected in the central Pacific region of Mexico.

Additional keywords: Mutants *nit*, heterocaryon, anastomosis, VCG, fruit crops, diseases.

---

Mango malformation is one of most destructive diseases of this crop (Kumar and Beniwal, 1992). The symptomatology includes an abnormal development of floral and vegetative shoots, which result in malformed inflorescences and leaves (Ploetz and Freeman, 2009). Mango malformation is a severe problem in the states of Guerrero and Michoacan (Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Mora-Aguilera *et al.*, 2003). *F. oxysporum* has been reported as the pathogen causing

sintomatología incluye un desarrollo anormal de los brotes florales y vegetativos, lo cual resulta en inflorescencias y hojas malformadas (Ploetz y Freeman, 2009). La malformación del mango es un problema severo en los estados de Guerrero y Michoacán (Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Mora-Aguilera *et al.*, 2003). *F. oxysporum* ha sido reportado como el patógeno causante de la malformación 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, *F. mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz y O'Donnell, sp. nov., ha sido descrito causando malformación del mango en Colima, Guerrero, Michoacán y Morelos, México (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2013). Varias especies del género *Fusarium* han sido reportadas como agentes causales de esta enfermedad (Marasas *et al.*, 2006). En India, Summanwar *et al.* (1966) y Varma *et al.* (1974) fueron los primeros investigadores en reportar un hongo, *Fusarium moniliforme* (posteriormente llamado *F. subglutinans*), como el agente causal de la malformación floral y vegetativa, respectivamente. Steenkamp *et al.* (2000) usaron secuencias de los genes histona H3 y beta-tubulina, para detectar dos grupos filogenéticamente distintos de aislados de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de mango. Un grupo fue establecido como conoespecífico con cepas de *F. subglutinans* cuya patogenicidad en mango había sido previamente demostrada (Freeman *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 1975; Manicom, 1989; Ploetz and Gregory, 1993). El segundo grupo de cepas constituyó un linaje único en el complejo *G. fujikuroi*. Britz *et al.* (2002) llevaron a cabo una caracterización morfológica de las cepas del primer grupo las cuales habían sido obtenidas en Egipto, Florida (E.E.U.U.), Israel, Malasia y África del Sur. El nombre de *Fusarium mangiferae* fue propuesto para este grupo de cepas por Britz *et al.* (2002). El segundo grupo de cepas había sido obtenido en Brasil y África del Sur y fue llamado *F. sterihilyphosum*. *F. proliferatum* ha sido detectado causando malformación del mango en China (Zhan *et al.*, 2010). *F. mangiferae* también ha sido reportado en China (Zhan *et al.*, 2012) y España (Crespo *et al.*, 2012). *F. tuiense* ha sido reportado causando malformación del mango en Brasil y Senegal (Lima *et al.*, 2009, 2012; Senghor *et al.*, 2012). Los aislados analizados en este estudio fueron obtenidos de árboles malformados de mango en Jalisco, México, en 2007, y fueron identificados como *F. mexicanum* (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012).

El análisis de Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV) en una población de aislados de hongos es útil para determinar la diversidad presente en esa población (Leslie and Summerell, 2006). Puhala (1979) llevó a cabo los primeros estudios en GCVs en hongos patógenos de plantas. Encontró 16 GCVs entre 86 aislados de *Verticillium dahliae* usando ensayos de complementación con mutantes (*nit*) que no utilizan nitrato. GCVs también han sido determinados en *F. oxysporum* (Puhalla, 1985), *Colletotrichum* spp. (Brooker

malformation in Michoacan and Morelos, and *F. subglutinans* in Guerrero and Michoacan (Díaz and Romero-Cova, 1980; Vega-Piña y Miranda-Salcedo, 1993; Noriega, 1996; Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Recently, *F. mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz and O'Donnell, sp. nov., has been described causing mango malformation in Colima, Guerrero, Michoacan and Morelos, Mexico (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Otero-Colina *et al.*, 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2013). Several species of the genus *Fusarium* have been reported as the causal agents of this disease (Marasas *et al.*, 2006). In India, Summanwar *et al.* (1966) and Varma *et al.* (1974) were the first researchers reporting a fungus, *Fusarium moniliforme* (later named as *F. subglutinans*), as the causative agent of floral and vegetative malformation, respectively. Steenkamp *et al.* (2000) using sequences from the histone H3 and beta-tubulin genes, detected two phylogenetically distinct groups of *Fusarium* isolates obtained from malformed mango tissues. One group was established as conspecific with *F. subglutinans* strains whose pathogenicity on mango had been previously demonstrated (Freeman *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 1975; Manicom, 1989; Ploetz and Gregory, 1993). The second group of strains constituted a unique lineage in the *G. fujikuroi* complex. Britz *et al.* (2002) carried out a morphological characterization on the strains from the first group which had been obtained in Egypt, Florida (USA), Israel, Malaysia and South Africa. The name *Fusarium mangiferae* was proposed for these groups of strains by Britz *et al.* (2002). The second group of strains had been obtained in Brazil and South Africa, and was called *F. sterihilyphosum*. *F. proliferatum* has been detected causing mango malformation in China (Zhan *et al.*, 2010). *F. mangiferae* has also been reported in China (Zhan *et al.*, 2012) and Spain (Crespo *et al.*, 2012). *F. tuiense* has been reported causing mango malformation in Brazil and Senegal (Lima *et al.*, 2009, 2012; Senghor *et al.*, 2012). The isolates analyzed in this study were obtained from malformed mango trees in Jalisco, Mexico, in 2007, and were identified as *F. mexicanum* (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012).

Analysis of Vegetative Compatibility Groups (VCG) in a population of fungal isolates is useful to determine the diversity present in that population (Leslie and Summerell, 2006). Puhala (1979) carried out the first studies on VCGs among plant pathogenic fungi. He found 16 VCGs among 86 *Verticillium dahliae* isolates using complementation assays with nonutilizing nitrate mutants (*nit*). VCGs have been also determined in *F. oxysporum* (Puhalla, 1985), *Colletotrichum* spp. (Brooker *et al.*, 1991), *F. subglutinans* type isolates from mango (Zheng and Ploetz, 2002) [these isolates were later named *F. mangiferae* (Britz *et al.*, 2002)], *Cercospora kikuchii* (Cai and Schneider, 2004), *F. mangiferae*, *F. sterihilyphosum* and *Fusarium* type *subglutinans* (Lima *et al.*, 2009a). Leslie and Summerell (2006) listed 49 fungal genera in which there is reported evidence that a vegetative compatibility system is present. If hyphae from two strains, from the same species, can anastomose and form a stable heterokaryon, these strains are said to be vegetative compatible and belong to the same VCG. If these strains

*et al.*, 1991), aislados tipo *F. subglutinans* de mango (Zheng y Ploetz, 2002) [esos aislados fueron posteriormente llamados *F. mangiferae* (Britz *et al.*, 2002)], *Cercospora kikuchii* (Cai y Schneider, 2004), *F. mangiferae*, *F. sterihilyphosum* y *Fusarium* tipo *subglutinans* (Lima *et al.*, 2009a). Leslie and Summerell (2006) mencionaron 49 géneros de hongos en los cuales hay evidencia reportada de que un sistema de compatibilidad vegetativa está presente. Si las hifas de dos cepas de la misma especie, pueden anastomosarse y formar un heterocarión estable, se dice que esas cepas son compatibles vegetativamente y pertenecen al mismo GCV. Si esas cepas no pueden fusionar las hifas de sus micelios, son incompatibles vegetativamente y pertenecen a diferentes GCVs (Puhalla, 1985; Leslie and Summerell, 2006). Los estudios sobre la compatibilidad vegetativa usan mutantes auxótrofos, llamados mutantes *nit*, de la ruta metabólica del nitrato, los cuales presentan lesiones que bloquean el uso de nitrato como una fuente de nitrógeno (Klittich and Leslie, 1988). Los mutantes auxótrofos son generados espontáneamente como sectores de rápido crecimiento en medio suplementado con análogos tóxicos del nitrato como clorato de potasio (Puhalla, 1985; Correll *et al.*, 1987).

El análisis de GCVs en estudios previos ha detectado dos GCVs en aislados de *F. mexicanum* de Michoacán, México (Betancourt-Resendes *et al.*, 2010). Esto indica que una diversidad baja fue detectada en esa población. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad presente en aislados de *F. mexicanum* de huertas de mango con malformación en Jalisco, México.

## MATERIALES Y METODOS

**Aislados.** Los aislados de *F. mexicanum* utilizados en este estudio fueron caracterizados previamente (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012) y fueron obtenidos de tejidos de mango malformados, colectados en una huerta localizada en el municipio de La Huerta, Jalisco, durante mayo del 2007. Estos aislados fueron identificados como *F. mexicanum* en base a las características morfológicas y genéticas, y están almacenados como suspensiones de conidios en glicerol al 15 % a -70 °C en la Colección de Hongos en el Laboratorio de Patología Vegetal (UMSNH). La patogenicidad de estos aislados de plantas de mango fue previamente confirmada (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012).

**Medios de cultivo.** Medio PDA (Papa Dextrosa Agar) fue preparado mezclando 39 g de PDA deshidratado en polvo (Bioxon) en 1000 mL de agua destilada. El medio basal (Correll *et al.*, 1987) contiene: 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 0.2 mL de una solución de elementos, 20 g agar (Bioxon). La solución de elementos contiene: 95 mL de agua destilada, 5 g ácido cítrico, 5 g ZnSO<sub>4</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 1 g Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 250 mg CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 50 mg MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 50 mg NaMoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O. El medio mínimo (MM) (Correll *et al.*, 1987) fue hecho agregando 2 g NaNO<sub>3</sub> y 30 g sacarosa en 1 L de medio basal. El medio de clorato (CM) es usado para recuperar mutantes (*nit*) que no utilizan nitrato para usarlos en pruebas de compatibilidad (Puhalla, 1985; Correll *et al.*, 1987). Fue

cannot fuse hyphae from their mycelia, they are vegetative incompatible and belong to different VCGs (Puhalla, 1985; Leslie and Summerell, 2006). Studies on vegetative compatibility use auxotroph mutants, named *nit* mutants, of the nitrate metabolic pathway, which present lesions that block the use of nitrate as a nitrogen source (Klittich and Leslie, 1988). Auxotroph mutants are spontaneously generated as fast growing mycelium sectors on media supplemented with toxic analogs of nitrate like potassium chlorate (Puhalla, 1985; Correll *et al.*, 1987).

VCGs analysis in previous studies has detected two VCGs in isolates of *F. mexicanum* from Michoacan, Mexico (Betancourt-Resendes *et al.*, 2010). This indicates that a low diversity was found in this population. The objective of this work was to determine the diversity present in *F. mexicanum* isolates from mango orchards with malformation in Jalisco, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

**Isolates.** *F. mexicanum* isolates utilized in this study were previously characterized (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012) from malformed mango tissues, collected in an orchard located in La Huerta county, Jalisco, during May of 2007. These isolates were identified as *F. mexicanum* based on morphological and genetic characteristics, and are stored as conidial suspensions in 15 % glycerol at -70 °C in the Fungal Collection at the Plant Pathology Laboratory (UMSNH). The pathogenicity of these isolates on mango plants was confirmed previously (Betancourt-Resendes *et al.*, 2012).

**Culture media.** PDA medium (Potato Dextrose Agar) was prepared by mixing 39 g of dehydrated PDA powder (Bioxon) in 1000 mL of distilled water. Basal medium (Correll *et al.*, 1987) contains: 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 0.2 ml trace element solution, 20 g agar (Bioxon). Trace element solution contains: 95 mL distilled water, 5 g citric acid, 5 g ZnSO<sub>4</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 1 g Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 250 mg CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 50 mg MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 50 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 50 mg NaMoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O. Minimal medium (MM) (Correll *et al.*, 1987) was made by adding 2 g NaNO<sub>3</sub> and 30 g sucrose in 1 L of basal medium. Chlorate medium (CM) is used for the recovery of nitrate nonutilizing (*nit*) mutants for use in compatibility tests (Puhalla, 1985; Correll *et al.*, 1987). It was prepared by adding 30 g sucrose, 2 g NaNO<sub>3</sub>, 1.6 g L-asparagine and 15 g KClO<sub>3</sub>, to 1 L of basal medium. Two concentrations of KClO<sub>3</sub> were used, 1.5 % (15 g/L) and 2.0 % (20 g/L), to determine which was most effective for generating *nit* mutants. To characterize phenotypically the *nit* mutants MM medium was prepared with four different nitrogen sources: MM supplemented with 1.6 g/L ammonium tartarate (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>), 2 g/L nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 0.5 g/L nitrite (NO<sub>2</sub><sup>2-</sup>) or 0.2 g/L hypoxanthine (Correll *et al.*, 1987). MM medium plus nitrite requires the use of Noble Agar (Difco).

**Inoculum.** Fungal inoculum from each isolate for the experiments was prepared by taking aliquots from frozen suspension of spores maintained in glycerol, plating 15 µl on PDA Petri plates 60 x 15 mm. Cultures were incubated under

preparado agregando 30 g sacarosa, 2 g NaNO<sub>3</sub>, 1.6 g L-asparagina y 15 g KClO<sub>3</sub>, para 1 L de medio basal. Dos concentraciones de KClO<sub>3</sub> fueron usadas, 1.5 % (15 g/L) y 2.0 % (20 g/L), para determinar cuál era más efectiva para generar mutantes *nit*. Para caracterizar fenotípicamente a los mutantes *nit* se preparó medio con cuatro fuentes de nitrógeno diferentes: MM suplementado con 1.6 g/L tartrato de amonio (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>), 2 g/L nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 0.5 g/L nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) o 0.2 g/L hipoxantina (Correll *et al.*, 1987). El medio MM más nitrito requiere el uso de agar Noble (Difco).

**Inóculo.** El inóculo de cada aislado para los experimentos fue preparado tomado alícuotas de una suspensión congelada de esporas mantenida en glicerol, sembrando 15 µl en cajas Petri 60 x 15 mm con PDA. Los cultivos fueron incubados bajo luz blanca a 25 °C por 7 a 10 d.

**Generación de mutantes.** Tres discos (2-mm<sup>3</sup>) de medio conteniendo hifas de la orilla de la colonia de cada aislado fueron transferidas a una caja Petri (100 x 15 mm) conteniendo medio de clorato. Los discos fueron colocados separados uno del otro formando un triángulo equilátero. Once cajas Petri con la concentración 1.5 % de clorato fueron usadas para un total de 33 discos para cada aislado. Mientras que seis cajas Petri de la concentración 2.0 % de clorato fueron usadas para un total de 18 discos para cada aislado. Las cajas Petri fueron colocadas a 25 °C bajo luz fluorescente blanca continua y revisadas cada día para detectar sectores. Cuando los discos desarrollaron sectores de micelio, una punta de hifa fue transferida a cajas Petri 60 x 15 mm con medio MM e incubadas como se mencionó. Los cultivos que generaban colonias con un micelio escaso y adherido a la superficie del medio, fueron considerados mutantes *nit* y mantenidos a 4 °C. Los cultivos que presentaban colonias con micelio aéreo y denso fueron considerados resistentes al clorato, no mutantes *nit* y fueron descartados (Correll *et al.*, 1987; Leslie and Summerell, 2006).

**Caracterización fenotípica de mutantes *nit*.** Los mutantes *nit* fueron transferidos a cajas Petri 60 x 15 mm conteniendo medio MM suplementado con una de cuatro diferentes fuentes de nitrógeno como se mencionó. Un disco de 2-mm<sup>3</sup> de medio conteniendo hifas de cada mutante *nit* fue colocado en el centro de cada una de dos cajas Petri. Los cultivos fueron incubados a 25 °C por 4 a 7 d. Las colonias con micelio aéreo abundante fueron consideradas como formadoras de “micelio denso”; mientras que las colonias con micelio escaso y hialino fueron consideradas como formadoras de “micelio no denso”. Los mutantes tipo *nit1* no son capaces de utilizar nitrato, los mutantes tipo *nit3* no pueden utilizar nitrato o nitrito, los mutantes tipo NitM son incapaces de utilizar nitrato o hipoxantina, los mutantes tipo *nnu* no pueden utilizar nitrato, nitrito o hipoxantina. Los mutantes *nnu* fueron generados espontáneamente cuando la concentración de clorato fue incrementada a 2.0 % en el medio CM; con una concentración de clorato de 1.5 % no se generaron estos mutantes. En medio MM más tartrato de amonio todos los mutantes *nit* crecen con micelio denso. Este medio es considerado como un control positivo porque el amonio (NH<sub>4</sub>) es el producto final en la ruta

white light at 25 °C for 7 to 10 d.

**Mutant generation.** Three disks (2-mm<sup>3</sup>) of medium containing hyphae from the edge of the colony of each isolate were transferred to each Petri plate (100 x 15 mm) containing chlorate medium. The disks were placed separated from each other forming an equilateral triangle. Eleven Petri plates of the 1.5 % chlorate concentration were used for a total of 33 disks for each isolate. While six Petri plates of the 2.0 % chlorate concentration were used for a total of 18 disks for each isolate. The Petri plates were placed at 25 °C under continuous fluorescent white light and checked every day for sectoring. When sectors of sparse aerial mycelium developed from the disks, a hyphal tip was transferred to Petri plates 60 x 15 mm with MM medium and cultured as mentioned above. Isolate cultures that retained the sparse mycelium characteristic were considered *nit* mutants and kept at 4 °C. Cultures that presented dense aerial mycelium were considered chlorate-resistant not *nit* mutants and discarded (Correll *et al.*, 1987; Leslie and Summerell, 2006).

**Phenotypic characterization of *nit* mutants.** The *nit* mutants were transferred to Petri plates 60 x 15 mm containing MM medium supplemented with one of four different sources of nitrogen as indicated above. One 2-mm<sup>3</sup> disk of medium containing hyphae of each *nit* mutant was placed in the center of each of two Petri plates. Cultures were incubated at 25 °C for 4 to 7 d. Colonies with abundant aerial mycelium were considered as having “dense” mycelium; while, colonies with sparse, hyaline mycelium were considered as “non dense” mycelium. Mutants type *nit1* are not able to utilize nitrate, mutants type *nit3* cannot utilize nitrate or nitrite, mutants type NitM are incapable to utilize nitrate or hypoxanthine, mutants type *nnu* cannot utilize nitrate, nitrite or hypoxanthine. The *nnu* mutants were generated spontaneously when the chlorate concentration was increased to 2.0 % in the CM medium; with a chlorate concentration of 1.5 % no such mutants were obtained. On MM medium plus ammonium tartrate all *nit* mutants grow with dense mycelium. This medium is considered as a positive control because ammonium (NH<sub>4</sub>) is the final product in the NO<sub>3</sub> metabolism pathway, and can be used directly by the *nit* mutants as well by the wild types isolates. MM plus nitrate is considered as the negative control because all *nit* mutants should grow non-dense (Figure 2) (Leslie and Summerell, 2006).

**Vegetative auto compatibility tests.** Field strains that are not capable of forming heterokaryons are termed heterokaryon self-incompatible or HSI (Correll *et al.*, 1989). These strains are identified using *nit* mutants generated from each isolate that is being tested for VCGs, in complementation tests with one another. Because those mutants were obtained from the same isolate, all must be in the same VCG and they should produce a prototrophic heterokaryon, assuming that the initial culture is pure. If the mutants fail to produce a heterokaryon, it indicates that the wild-type isolated from which they were generated is a HIS strain and it will be vegetative incompatible with all other strains. The HSI strains are eliminated from further testing (Leslie and Summerell, 2006).

metabólica del  $\text{NO}_3$ , y puede ser usado directamente por los mutantes *nit* al igual que por los aislados de tipo silvestre. MM más nitrato es considerado como un control negativo porque todos los mutantes *nit* deben producir micelio no denso (Figura 2) (Leslie and Summerell, 2006).

**Pruebas de auto compatibilidad vegetativa.** Las cepas obtenidas en campo que no son capaces de formar heterocariones son llamadas heterocariones auto-incompatibles o HSI (Correll *et al.*, 1989). Esas cepas son identificadas usando mutantes *nit* generados de cada aislado que está siendo analizado para GCVs, en pruebas de complementación entre ellas mismas. Debido a que los mutantes son obtenidos del mismo aislado, todos deben estar en el mismo GCV y deben de producir un heterocarión protótrofo, si se asume que el cultivo original es puro. Si los mutantes fallan en producir un heterocarión, esto indica que el aislado tipo silvestre del cual fueron generados es una cepa HIS y será incompatible vegetativamente con todas las otras cepas. Las cepas HSI son eliminadas de las pruebas posteriores (Leslie and Summerell, 2006).

Los mutantes *nit1/nit3* y NitM/*nnu* de cada aislado fueron apareados en pruebas de complementación. Todas las pruebas de complementación se llevaron a cabo en cajas Petri 100 x 15 mm con medio MM suplementado con  $\text{NO}_3^-$  como la única fuente de nitrógeno disponible para los cultivos. Los cultivos de los mutantes usados como inóculo para las pruebas de complementación fueron crecidos en medio MM más  $\text{NO}_3^-$ . Un disco de 2-m m de medio y micelio de los mutantes NitM o *nnu* fue colocado en el centro de la caja. Cuatro discos de los mutantes *nit1* o *nit3* fueron colocados en la caja formando un cuadro, con el mutante NitM o *nnu* en el centro. Los cultivos fueron incubados en la oscuridad a 25 °C por 7 a 14 d. Una vez que las colonias hacen contacto, se observa la formación inicial del micelio heterocarión en uno o dos días. Micelio completamente denso y aéreo puede ser observado de 5 a 14 d. Las cepas que son capaces de formar un heterocarión entre sus mutantes son llamadas heterocarión auto-compatibles o HSC (Leslie and Summerell, 2006).

**Pruebas de compatibilidad vegetativa.** Para determinar los GCVs presentes en el grupo de aislados de *F. mexicanum* analizados, se llevaron a cabo apareamientos entre los mutantes *nit* derivados de cada aislado. Dos mutantes *nit1* o *nit3* fueron seleccionados para cada aislado. El protocolo de apareamiento es similar al descrito en la sección previa. Sin embargo, en este caso dos cepas fueron probadas en su compatibilidad en cada caja. Un disco de la cepa A de un mutante *nit1* o *nit3* es colocado en la parte superior izquierda, un disco de la cepa B de un mutante NitM o *nnu* es colocado en la parte superior derecha, un disco de la cepa A de un mutante NitM o *nnu* es colocado en la parte inferior izquierda, y un disco de la cepa B de un mutante *nit1* o *nit3* es colocado en la parte inferior derecha. Esta disposición resulta en un control positivo apareándose para cada cepa. Si un heterocarión se forma entre cada una de los cuatro pares de colonias entonces las cepas A y B están en el mismo GCV. Si un heterocarión se forma solamente entre los controles positivos de ambas cepas, entonces cada cepa está en un GCV diferente (Leslie and Summerell, 2006).

Mutantes *nit1/nit3* and NitM/*nnu* from each isolate were paired in complementary tests. All complementation tests were carried out in Petri plates 100 x 15 mm with MM medium supplemented with  $\text{NO}_3^-$  as the only nitrogen source available to the cultures. The mutant cultures used as inoculums for the complementation tests were grown in MM medium plus  $\text{NO}_3^-$ . One 2-m m disk of medium and mycelium of the NitM or *nnu* mutants was placed in the center of the plate. Four disks of the *nit1* or *nit3* mutants were placed in the plate forming a square with the NitM or *nnu* mutant in the center. Cultures were incubated in the dark at 25 °C for 7 to 14 d. Once colonies make contact, it takes one or two days more to see the initial formation of the heterokaryon mycelia. Full dense aerial mycelia can be observed from 5 to 14 d. Strains that are capable of forming a heterokaryon among its mutants are termed heterokaryon self-compatible or HSC (Leslie and Summerell, 2006).

**Vegetative compatibility tests.** In order to determine the VCGs present in the group of isolates of *F. mexicanum* analyzed, pairings were carried out between *nit* mutants derived from each isolate. Two *nit1* or *nit3* mutants were selected for each isolate. The pairing protocol is similar to the one described in the previous section. However, in this case two strains are tested for compatibility in each plate. One disk of strain A of mutant *nit1* or *nit3* is placed in the upper left, one disk of strain B of mutant NitM or *nnu* is placed in the upper right, one disk of strain A of mutant NitM or *nnu* is placed in the lower left, and one disk of strain B of mutant *nit1* or *nit3* is placed in the lower right. This display will result in a positive control pairing for each strain. If a heterokaryon forms between each of the four colony pairs then strains A and B are in the same VCG. If a heterokaryon forms only between the positive controls of both strains, then each strain is in a different VCG (Leslie and Summerell, 2006).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Generation of *nit* mutants.** A total of 128 chlorate-resistant sectors of mycelia were produced when 1.5 % of chlorate was utilized in the CM medium (Table 1). Two isolates were incapable of producing sectors in this chlorate concentration, MXJAL-5 and MXJAL-17. Sectors of mycelia were initially detected between days 4 and 6 after the plates were inoculated with the disks (Figure 1). The frequency of sector generation among the isolates varied from 15 % (MXJAL-13) to 46 % (MXJAL-19) (Table 1). When the sectors were transferred to MM with nitrate, 48 % developed non-dense mycelia which indicated that they were *nit* mutants not capable of utilizing nitrate as a nitrogen source (128 transferred sectors / 62 *nit* mutants) (Table 1). The sectors that developed into dense mycelium were considered chlorate-resistant, nitrate-utilizing isolates and discarded from further testing. A second experiment using 2 % potassium chlorate in the mutant medium produced 111 chlorate-resistant sectors of mycelium (Table 1). All of the isolates were able to generate sectors using this concentration of chlorate. The frequency of generation of sectors chlorate-resistant varied among the isolates from 11 % (MXJAL-13) to 77 % (MXJAL-3) (Table 1). On MM

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Generación de mutantes *nit*.** Un total de 128 sectores de micelio resistentes al clorato fueron producidos cuando se utilizó clorato al 1.5 % en el medio CM (Cuadro 1). Dos aislados fueron incapaces de producir sectores en esta concentración de clorato, MXJAL-5 y MXJAL-17. Sectores de micelio fueron inicialmente detectados entre 4 y 6 d después de que las cajas fueron inoculadas con los discos (Figura 1). La frecuencia de generación de sectores entre los aislados varió de 15 % (MXJAL-13) a 46 % (MXJAL-19) (Cuadro 1). Cuando los sectores fueron transferidos a MM con nitrato, 48 % desarrollaron micelio no denso lo cual indicó que eran mutantes *nit* incapaces de utilizar nitrato como una fuente de nitrógeno (128 sectores transferidos / 62 mutantes *nit*) (Cuadro 1). Los sectores que desarrollaron micelio denso fueron considerados como aislados resistentes al clorato que utilizan nitrato y descartados de

Cuadro 1. Efecto de la concentración del clorato de potasio ( $\text{KClO}_3$ ) en la generación de mutantes *nit* de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de árboles malformados de mango en Jalisco.

Table 1. Effect of potassium chlorate ( $\text{KClO}_3$ ) concentration on the generation of *nit* mutants of *Fusarium mexicanum* isolates obtained from mango malformed trees in Jalisco.

Isolates	Discs with sectors (%) <sup>u</sup>	Total sectors <sup>v</sup>	Total <i>nit</i> mutants <sup>w</sup>
MXJAL-1	25 <sup>x</sup> /38 <sup>y</sup>	8 <sup>x</sup> /7 <sup>y</sup>	4 <sup>x</sup> /7 <sup>y</sup>
MXJAL-2	43/61	14/11	5/11
MXJAL-3	34/77	11/14	7/10
MXJAL-4	28/33	9/6	3/3
MXJAL-5	0/16	0/3	0/3
MXJAL-6	25/55	8/10	4/7
MXJAL-7	43/38	14/7	3/7
MXJAL-8	31/50	10/9	6/7
MXJAL-10	28/44	9/8	5/5
MXJAL-11	28/27	9/5	2/4
MXJAL-13	15/11	5/2	5/2
MXJAL-14	28/33	9/6	6/6
MXJAL-17	0/61	0/11	0/8
MXJAL-18	27/33	7/6	3/3
MXJAL-19	46/33	15/6	9/4
Total	26.7/40.6 <sup>z</sup>	128/111	62/87

<sup>u</sup> Sectors of mycelium appear spontaneously on a minimal medium supplemented with  $\text{KClO}_3$ . Nitrogen sources were  $\text{NaNO}_3$  and L-asparagine

<sup>v</sup> Mycelium sectors transferred to minimal medium without  $\text{KClO}_3$ . Nitrogen source was  $\text{NaNO}_3$

<sup>w</sup> Total numbers of chlorate-resistant sectors that developed as *nit* mutants.

<sup>x</sup>  $\text{KClO}_3$  1.5 %. 32 discs of medium and mycelia were used per isolate

<sup>y</sup>  $\text{KClO}_3$  2.0 %. 18 discs of medium and mycelia were used per isolate

<sup>z</sup> Percent average of the 15 isolates

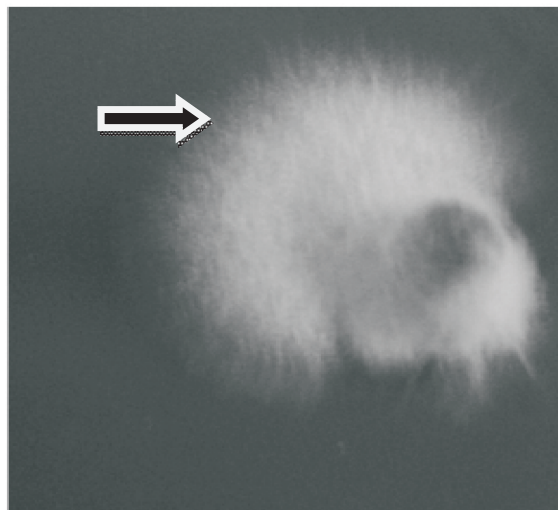


Figura 1. Un sector de micelio (flecha) de *Fusarium mexicanum* creciendo en medio mínimo suplementado con  $\text{KClO}_3$  1.5 %, produciendo un mutante (*nit*) resistente al clorato, que no utiliza  $\text{NO}_3^-$ .

Figure 1. A mycelia sector (arrow) of *Fusarium mexicanum* growing on minimal medium supplemented with 1.5 %  $\text{KClO}_3$ , producing a chlorate-resistant,  $\text{NO}_3^-$ -non-utilizing mutant (*nit*).

medium with nitrate, 78 % of the sectors developed *nit* mutants (111 transferred sectors / 87 *nit* mutants) (Table 1).

CM medium supplemented with 2 % potassium chlorate was useful to obtain mutants in all the isolates. In six isolates all the sectors generated resulted in *nit* mutants. The average frequency among the *F. mexicanum* isolates for the generation of spontaneous, chlorate-resistant sectors for this potassium chlorate concentration was 40.6 % (Table 1). Meanwhile, the average frequency when the CM medium was supplemented with 1.5 % potassium chlorate was 26.7 % (Table 1). The increase in the frequency of sector generation due to higher chlorate concentrations in the CM medium has been reported by Leslie and Summerell (2006). The observed variation among the *F. mexicanum* isolates on the frequency and quickness to generate sectors of mycelium chlorate-resistant has also been detected in *F. oxysporum* and other *Fusarium* species in the *Gibberella fujukuroi* complex of species (Puhallla, 1985; Leslie and Summerell, 2006).

**Phenotypic characterization.** A total of 149 mutants generated from fifteen isolates of *F. mexicanum* were characterized in their use of different nitrogen sources (Figure 2). The frequency of phenotype *nit1* was 36.91 %, phenotype *nit3* had a frequency of 28.18 %, and for phenotype NitM was 19.46 %. These results are similar to those reported for other filamentous fungi (Chun and Fenn, 2000). Mutants *nnu* not capable of utilizing nitrate, nitrite and hypoxanthine had a frequency of 14.76 % (Table 2). MXJAL-2 isolate showed the highest frequency of *nit1* mutants, 56.2 %, MXJAL-3 isolate presented the highest frequency for *nit3* mutants with 64.7 %, and MXJAL-7

pruebas posteriores. Un segundo experimento usando 2 % de clorato de potasio en el medio para generar mutantes produjo 111 sectores de micelio resistentes al clorato (Cuadro 1). Todos los aislados fueron capaces de generar sectores usando esta concentración de clorato. La frecuencia de generación de sectores resistentes al clorato varió entre los aislados de 11 % (MXJAL-13) a 77 % (MXJAL-3) (Cuadro 1). En medio MM con nitrato, 78 % de los sectores desarrolló mutantes *nit* (111 sectores transferidos / 87 mutantes *nit*) (Cuadro 1).

Medio CM suplementado con 2 % de clorato de potasio fue útil para obtener mutantes en todos los aislados. En seis aislados todos los sectores generados resultaron en mutantes *nit*. La frecuencia promedio entre los aislados de *F. mexicanum* para la generación de sectores espontáneos resistentes al clorato para esta concentración de clorato de potasio fue de 40.6 % (Cuadro 1). Mientras que el promedio de la frecuencia cuando el medio CM fue suplementado con 1.5 % clorato de potasio fue de 26.7 % (Cuadro 1). El incremento en la frecuencia de generación de sectores debido a la concentración más alta de clorato en el medio CM ha sido reportado por Leslie y Summerell (2006). La variación observada entre los aislados de *F. mexicanum* en la frecuencia y rapidez para generar sectores de micelio resistentes al clorato ha sido también detectada en *F. oxysporum* y otras especies de *Fusarium* en el complejo de especies de *Gibberella fujikuroi* (Puhallla, 1985; Leslie and Summerell, 2006).

**Caracterización fenotípica.** Un total de 149 mutantes generados de quince aislados de *F. mexicanum* fueron caracterizados en su uso de fuentes de nitrógeno diferentes (Figura 2). La frecuencia del fenotipo *nit1* fue 36.91 %, fenotipo *nit3* tuvo una frecuencia de 28.18 %, y para el fenotipo NitM fue 19.46 %. Estos resultados son similares a los reportados para otros hongos filamentosos (Chun y Fenn, 2000). Los mutantes *nnu* no son capaces de utilizar nitrato, nitrito e hipoxantina, tuvieron una frecuencia de 14.76 % (Cuadro 2). El aislado MXJAL-2 mostró la más alta frecuencia de los mutantes *nit1* con 56.2 %, el aislado MXJAL-3 presentó la más alta frecuencia para los mutantes *nit3* con 64.7 %, y el aislado MXJAL-7 generó la más alta frecuencia de los mutantes NitM con 40 % (Cuadro 2).

La variación en la frecuencia de los fenotipos obtenida para los aislados de *F. mexicanum* de Jalisco es similar a la reportada para otras especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). En este estudio, el medio CM fue suplementado con L-asparagina como una fuente de nitrógeno. La adición de este aminoácido al medio induce una mayor generación de mutantes *nit1* y una menor proporción de mutantes NitM (Leslie and Summerell, 2006).

Leslie y Summerell (2006) reportaron que hay dos loci involucrados en la utilización de nitrato en *Fusarium*. Uno es un regulador global del nitrógeno llamado *nnu* (Kinzel y Leslie, 1985; Leslie, 1987). Reguladores de nitrógeno similares han sido descritos en *Neurospora crassa* (*nit-2*) y *Aspergillus nidulans* (*areA*) (Dickman y Leslie, 1992). Los genes *nit-2* y *areA* codifican una proteína

isolate generated the highest frequency of NitM with 40 % (Table 2).

The variation in the frequency of phenotypes obtained for the *F. mexicanum* isolates from Jalisco is similar to that reported for other *Fusarium* species (Leslie and Summerell, 2006). In this study, the CM medium was supplemented with L-asparagine as a nitrogen source. The addition of this amino acid to the medium induces a major generation of *nit1* mutants and a lesser proportion of NitM mutants (Leslie and Summerell, 2006).

Leslie and Summerell (2006) reported that there are two regulatory loci involved in nitrate utilization in *Fusarium*. One is a global nitrogen regulator named *nnu* (Kinzel and Leslie, 1985; Leslie, 1987). Similar global nitrogen regulators have been described in *Neurospora crassa* (*nit-2*) and *Aspergillus nidulans* (*areA*) (Dickman and Leslie, 1992). Genes *nit-2* and *areA* encode a positive-acting regulatory protein that is a member of the GATA family of transcription factors (Feng and Marzluf, 1998). This protein turns on the genes whose products catabolize and assimilate many secondary nitrogen sources (Fu and Marzluf, 1990). When lesions occur in these loci, loss-of-function *areA* and *nit-2* mutants are unable to utilize any nitrogen source other than glutamine and ammonium (Arst and Cove, 1973; Marzluf, 1997). Usually, mutants in the gene encoding the global nitrogen regulator are not obtained in minimal medium supplemented with chlorate (Leslie and Summerell, 2006).

A group of 22 mutants, representing 14.7 % of the total of *nit* mutants generated in this study, were not able to grow on MM supplemented with nitrate, nitrite or hypoxanthine (Table 2). Eight MXJAL isolates generated 1 to 3 of this type of mutants, while isolates MXJAL-14 and MXJAL-17 generated 5 and 6 mutants, respectively (Table 2). These mutants were used in complementary testing with *nit1* and *nit3* mutants, in the instances where some isolates were not capable of generating NitM mutants. Further characterization of these mutants is necessary to better understand if *F. mexicanum* is more susceptible to mutations in a global nitrogen regulator gene, when high chlorate concentrations are supplemented in the CM medium.

**Vegetative compatibility.** Auto compatibility tests showed that mutants *nit1* or *nit3* were capable to complement mutants NitM or *nnu* in the same isolate, for all the fifteen MXJAL isolates studied. Five isolates, MXJAL-1, MXJAL-2, MXJAL-7, MXJAL-8 and MXJAL-10, produced a line of heavy growth where the colonies made contact on the agar surface 10 days after inoculating the plates with the mycelia disks, indicating auto-complementation. The rest of the isolates required 15 d to complete the tests. Mutants *nnu* had a similar response regarding formation of dense prototrophic mycelium to mutants NitM, in complementation tests with *nit1* or *nit3* mutants. This is the first report of mutants *nnu* being used as complementary strains in identification of VCGs.

Utilizing complementary pairings of *nit1* or *nit3* with NitM or *nnu* mutants from all the isolates (Klittich and Leslie, 1988), two VCGs were identified among the *F. mexicanum* isolates from Jalisco (Table 3). If two isolates

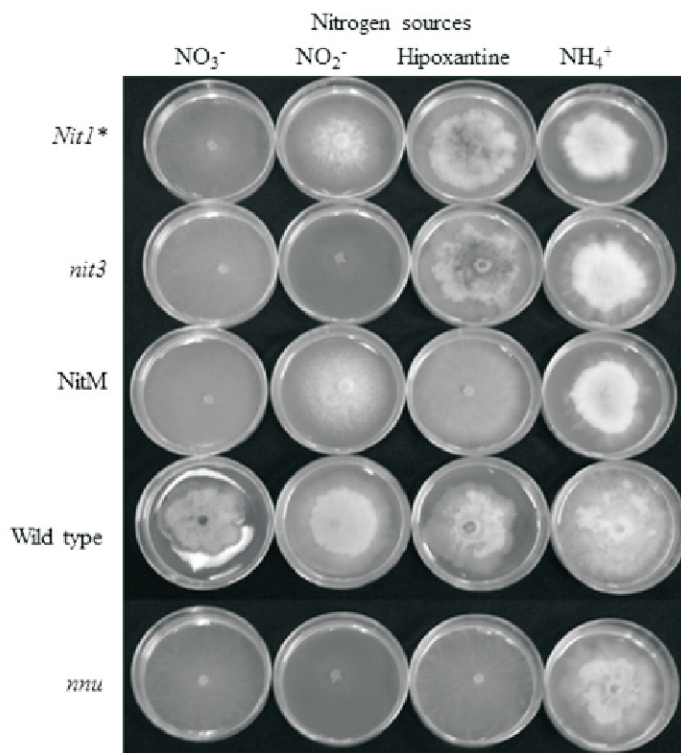


Figura 2. Clasificación fenotípica de mutantes (*nit*) de *Fusarium mexicanum* que no utilizan nitrato, por su crecimiento en medio mínimo suplementado con varias fuentes de nitrógeno. \* Tipos de mutantes.

Figure 2. Phenotypic classification of nitrate nonutilizing (*nit*) mutants from *Fusarium mexicanum* by growth on minimal medium supplemented with various nitrogen sources. \* Mutant types.

regulatoria que actúa positivamente y es un miembro de la familia GATA de factores de transcripción (Feng y Marzulf, 1998). Esta proteína activa los genes cuyos productos catabolizan y asimilan muchas fuentes secundarias de nitrógeno (Feng y Marzulf, 1990). Cuando ocurren lesiones en estos loci, los mutantes pierden la función de *areA* y *nit-2* y son incapaces de utilizar cualquier fuente de nitrógeno diferente de glutamina y amonio (Arst y Cove, 1973; Marzulf, 1997). Usualmente, los mutantes en el gen que codifica el regulador global de nitrógeno no son obtenidos en medio mínimo suplementado con clorato (Leslie y Summerell, 2006).

Un grupo de 22 mutantes, representando el 14.7 % del total de los mutantes *nit* generados en este estudio, no fueron capaces de crecer en MM suplementado con nitrato, nitrito o hipoxantina (Cuadro 2). Ocho aislados MXJAL generaron de 1 a 3 mutantes de este tipo, mientras que los aislados MXJAL-14 y MXJAL-17 generaron 5 y 6 mutantes, respectivamente (Cuadro 2). Estos mutantes fueron usados en pruebas complementarias con mutantes *nit1* y *nit3*, en los casos donde algunos aislados no fueron capaces de generar mutantes NitM. Es necesario caracterizar en más detalle estos mutantes para entender mejor si *F. mexicanum* es más susceptible de mutaciones en un gene regulador global del nitrógeno, cuando se suplementa al medio CM con concentraciones altas de

were vegetative compatible, a line of dense prototrophic mycelium formed when the colonies made contact, indicating that they were in the same VCG (Figure 3). Mutants from each VCG of four isolates, two from each VCG, were selected to carry out complementary testing with *F. mexicanum nit* mutants from the two VCGs identified in Michoacan (Betancourt-Resendes *et al.*, 2010). *F. mexicanum* isolates from Michoacan from one VCG were capable of forming heterokaryon mycelium with isolates from Jalisco (VCG 2) (Table 3). Isolates from Michoacan from a second VCG were not capable of forming a line of dense prototrophic mycelium in these assays with isolates from Jalisco (VCG 1). The results indicated that *F. mexicanum* isolates from Jalisco and Michoacan can be placed in three VCGs, named tentatively here as VCG 1, VCG 2, and VCG 3 (Table 3).

VCG testing has been carried out in three other *Fusarium* taxons associated with mango malformation. Steenkamp *et al.* (2000) analyzed isolates of *F. subglutinans sensu lato*, which were later identified as *F. mangiferae* and *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002), reporting three VCGs (VCG 1, VCG 2 and VCG 3) for isolates of *F. mangiferae* obtained from malformed mango in Israel, Florida (USA) and South Africa. Additionally, Steenkamp *et al.* (2000) reported a VCG 4 for isolates of *F. sterilihyphosum* obtained in South Africa. Zheng and Ploetz (2002) examined the



Cuadro 2. Frecuencia de fenotipos de mutantes *nit* de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de malformación del mango en Jalisco, México.

Table 2. Frequency of phenotypes of *nit* mutans of *Fusarium mexicanum* isolates obtained from mango malformation in Jalisco, Mexico.

Isolates	Phenotypes				Total of mutants characterized
	<i>nit1</i>	<i>nit3</i>	NitM	<i>nnu</i>	
MXJAL-1	5	2	4	0	11
MXJAL-2	9	4	2	1	16
MXJAL-3	3	11	1	2	17
MXJAL-4	2	1	3	0	6
MXJAL-5	1	0	1	1	3
MXJAL-6	5	0	4	2	11
MXJAL-7	4	2	4	0	10
MXJAL-8	2	8	2	1	13
MXJAL-10	6	1	3	0	10
MXJAL-11	2	2	1	1	6
MXJAL-13	2	4	0	1	7
MXJAL-14	3	3	1	5	12
MXJAL-17	0	1	1	6	8
MXJAL-18	5	0	1	0	6
MXJAL-19	6	3	1	3	13
Total of phenotypes	55	42	29	22	149
Percentage of phenotypes	36.91	28.18	19.46	14.76	100

clorato.

**Compatibilidad vegetativa.** Las pruebas de auto compatibilidad mostraron que los mutantes *nit1* o *nit3* fueron capaces de complementar mutantes NitM o *nnu* en el mismo aislado, para todos los quince aislados MXJAL estudiados. Cinco aislados, MXJAL-1, MXJAL-2, MXJAL-7, MXJAL-8 y MXJAL-10, produjeron una línea densa de crecimiento donde las colonias hicieron contacto en la superficie del agar, 10 d después de inocular las cajas con los discos de micelio, lo que indicó auto-complementación. El resto de los aislados requirió de 15 d para completar las pruebas. Los mutantes *nnu* tuvieron una respuesta similar en cuanto a la formación de micelio denso, protótrofo, heterocarión, con respecto a los mutantes NitM, en las pruebas de complementación con mutantes *nit1* o *nit3*. Este es el primer reporte de mutantes *nnu* siendo usados como cepas complementarias en la identificación de GCVs en *Fusarium*.

Al utilizar apareamientos complementarios de mutantes *nit1* o *nit3* con mutantes NitM o *nnu* de todos los aislados (Klittich and Leslie, 1988), dos GCVs fueron identificados entre los aislados de *F. mexicanum* de Jalisco (Cuadro 3). Si dos aislados fueron compatibles vegetativamente, una línea de micelio protótrofico denso se formó donde las colonias hacían contacto, indicando que

genetic diversity of 74 *F. subglutinans sensu lato* isolates from malformed mango in Brazil, Egypt, Florida (USA), India, Israel and South Africa. These authors identified seven VCGs, Egypt and USA presenting the greatest diversity with four and three VCGs, respectively. Brazil, India and South Africa showed one VCG only. The Brazilian isolates (VCG 7) were later confirmed as *F. sterilihyphosum* (Marasas *et al.*, 2006). Recently, Lima *et al.* (2009a) evaluated genotypic diversity in isolates of *Fusarium 'subglutinans'* (*F. tuiense*) reported as a causal agent of mango malformation in Brazil (Lima *et al.*, 2009b, 2012). Six VCGs were identified amongst the isolates collected in 13 sites in Brazil, which correlated with the six genetic groups found with AFLPs. VCG 17 AFLP 1 was detected in seven sites, while one VCG was detected in three sites and the rest of VCGs were identified in single-sites.

The results obtained in this study are similar to those reported by Steenkamp *et al.* (2000), Zheng and Ploetz (2002) and Lima *et al.* (2009a). Those authors indicated the presence of several VCGs amongst isolates of fusaria causing mango malformation from diverse geographical regions, which suggested certain degree of genetic variation and that these populations were reproducing clonally (Lima *et al.*, 2009a). It is also possible that a higher number of isolates analyzed could produce additional VCGs. The

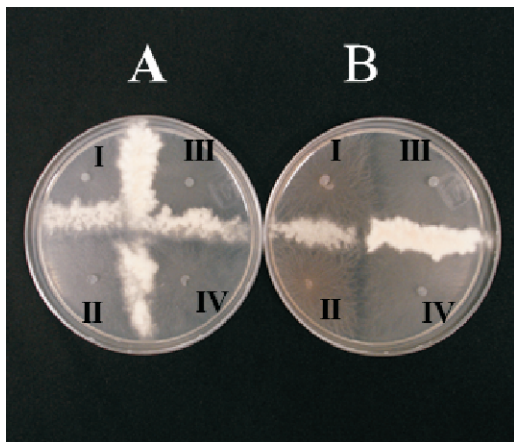


Figura 3. Heterocariones protótrofos formados en medio mínimo suplementado con  $\text{NaNO}_3$  por mutantes *nit* generados de aislados de *Fusarium mexicanum*. A) Pruebas de complementación vegetativa entre mutantes de aislados en el mismo GCV. AI, AII) mutantes NitM y *nit1* respectivamente de MXJAL-8. AIII, AIV) mutantes NitM y *nit1* respectivamente de aislados MXJAL-3. B) Pruebas de complementación vegetativa entre mutantes de aislados en GCVs diferentes. BI, BII) mutantes NitM y *nit1* respectivamente de aislado MXJAL-8. BIII, BIV) mutantes NitM y *nit1* respectivamente de aislado MXJAL-2.

Figure 3. Prototrophic heterokaryons formed on minimal medium supplemented with  $\text{NaNO}_3$  by *nit* mutants generated from isolates of *Fusarium mexicanum*. A) Vegetative complementation tests amongst mutants from isolates in the same VCG. AI, AII) mutants NitM and *nit1* respectively of MXJAL-8. AIII, AIV) mutants NitM and *nit1* respectively of isolate MXJAL-3. B) Vegetative complementation tests amongst mutants from isolates in different VCGs. BI, BII) mutants NitM and *nit1* respectively of isolate MXJAL-8. BIII, BIV) mutants NitM and *nit1* respectively of isolate MXJAL-2.

estaban en el mismo GCV (Figura 3). Mutantes de cada GCV de cuatro aislados, dos de cada GCV, fueron seleccionados para llevar a cabo pruebas complementarias con mutantes *nit* de *F. mexicanum* de dos GCVs identificados en Michoacán (Betancourt-Resendes *et al.*, 2010). Aislados de *F. mexicanum* de Michoacán de un GCV fueron capaces de formar micelio heterocarión con aislados de Jalisco (VCG 2) (Cuadro 3). Aislados de Michoacán de un segundo VCG no fueron capaces de formar una línea densa de micelio protótrofo en estos ensayos con los aislados de Jalisco (VCG 1). Los resultados indicaron que los aislados de *F. mexicanum* de Jalisco y Michoacán pueden ser colocados en tres GCVs, nombrados tentativamente aquí como GCV 1, GCV 2, y GCV 3 (Cuadro 3).

Pruebas de GCV se han realizado en otros tres taxones de *Fusarium* asociados con la malformación del mango. Steenkamp *et al.* (2000) analizaron aislados de *F. subglutinans sensu lato*, los cuales fueron posteriormente identificados como *F. mangiferae* y *F. sterilihphosum*

presence of one VCG in two states (Jalisco y Michoacan) suggests that the pathogen is reproducing clonally and it is probably being disseminated through transport of infected vegetative material.

The use of VCG analysis is a useful tool to determine the genetic diversity of fusaria causing malformation in mango producing areas in Mexico. This is the main disease affecting this crop in the central western region (Fernández-Pavía *et al.*, 2006; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008). Lack of sanitary regulations in the transit of vegetative material from mango nurseries to distant regions in a country, could contribute to disseminate this pathogen (Zheng and Ploetz, 2002). Additional samplings that include other regions, cultivars and phenologic periods, will be required to confirm the number of VCGs detected in this study.

### CONCLUSIONS

Two vegetative compatibility groups were detected among *F. mexicanum* isolates obtained from mango malformed tissue in Jalisco. One of this VCG has also been detected in Michoacan populations of this fungus. The three VCGs identified in this study for *F. mexicanum*, shown that there is genetic variation in this species and that the pathogen is reproducing clonally in mango growing areas in the central Pacific region of Mexico.

**Acknowledgments.** This work was supported by a Grant for Basic Science Research from CONACYT thorough Project No. 84578 to G. Rodríguez-Alvarado.

Cuadro 3. Distribución geográfica y número de grupos de compatibilidad vegetativa en aislados de *Fusarium mexicanum* causantes de la malformación del mango en la región centro occidente de México.

Table 3. Geographic distribution and number of vegetative compatibility groups in *Fusarium mexicanum* isolates causing mango malformation in the central western region of Mexico.

Isolates	VCG*			Geographic location
	1	2	3	
MXJAL-1	+			Jalisco
MXJAL-3		+		Jalisco
MXJAL-7	+			Jalisco
MXJAL-8		+		Jalisco
MXMIC-1			+	Michoacan
MXMIC-10		+		Michoacan
MXMIC-13		+		Michoacan
MXMIC-15			+	Michoacan

\*VCG 1-3 indicates tentative numbering for the *F. mexicanum* vegetative compatibility groups.

(Britz *et al.*, 2002), reportando tres GCVs (GCV 1, GCV 2 y GCV 3) para aislados de *F. mangiferae* obtenidos de mango malformado en Israel, Florida (E.E.U.U.) y África del Sur. Adicionalmente, Steenkamp *et al.* (2000) reportaron un GCV 4 para aislados de *F. sterilihyphosum* obtenidos en África del Sur. Zheng and Ploetz (2002) examinaron la diversidad genética de 74 aislados de *F. subglutinans sensu lato* de mango malformado en Brasil, Egipto, Florida (E.E.U.U.), India, Israel y África del Sur. Estos autores identificaron siete GCVs, en Egipto y E.E.U.U. presentando la mayor diversidad con cuatro y tres GCVs, respectivamente. Brasil, India y África del Sur mostraron solamente un GCV. Los aislados Brasileños (GCV 7) fueron posteriormente confirmados como *F. sterilihyphosum* (Marasas *et al.*, 2006). Recientemente, Lima *et al.* (2009a) evaluaron la diversidad genotípica en aislados de *Fusarium 'subglutinans' (F. tuiense)* reportado como agente causal de la malformación del mango en Brasil (Lima *et al.*, 2009b, 2012). Seis GCV fueron identificados entre los aislados colectados en 13 sitios en Brasil, los cuales se correlacionaban con seis grupos genéticos detectados con AFLPs. El GCV 17/AFLP 1 fue detectado en siete sitios, mientras que un GCV fue detectado en tres y el resto de los GCVs fueron identificados en localidades individuales.

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Steenkamp *et al.* (2000), Zheng y Ploetz (2002) y Lima *et al.* (2009a). Esos autores indicaron sobre la presencia de varios GCVs entre los aislados de fusaria causantes de la malformación del mango de regiones geográficas diversas, lo cual sugería cierto grado de variación genética y que esas poblaciones estaban reproduciéndose clonalmente (Lima *et al.*, 2009a). También es posible que un número mayor de aislados analizados pudiera producir GCVs adicionales. La presencia de un GCV en dos estados (Jalisco y Michoacán) sugiere que el patógeno se está reproduciendo clonalmente y está probablemente siendo diseminado a través del transporte de material vegetal infectado.

El uso del análisis de GCV es una herramienta útil para determinar la diversidad genética de fusaria causante de la malformación del mango en áreas productoras en México. Esta es la principal enfermedad afectando este cultivo en la región centro occidente (Fernández-Pavía *et al.*, 2006; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008). La ausencia de regulaciones sanitarias en el tránsito de material vegetativo de viveros de mango a regiones distantes en un país, podría contribuir a diseminar este patógeno (Zheng and Ploetz, 2002). Muestreo adicionales que incluyan otras regiones, cultivares y etapas fenológicas es requerido para confirmar el número de GCVs detectados en este estudio.

## CONCLUSIONES

Dos grupos de compatibilidad vegetativa fueron detectados entre aislados de *F. mexicanum* obtenidos de tejido malformado de mango en Jalisco. Uno de estos GCV también ha sido detectado en poblaciones de este hongo en Michoacán. Los tres GCVs identificados en este estudio para *F. mexicanum*, mostraron que hay variación genética en esta especie y que el patógeno se está reproduciendo

## LITERATURA CITADA

- Arst Jr HN and Cove DJ. 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 126:111-141.
- Betancourt-Resendes I, Gonzaga Espíritu JF, Fernández Pavía SP y Rodríguez Alvarado G. 2010. Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) con malformación en Michoacán. *Biológicas* 12: 135-142.
- Betancourt-Resendes I, Velázquez-Monreal JJ, Montero-Castro JC, Fernández-Pavía SP, Lozoya-Saldaña H and Rodríguez-Alvarado G. 2012. *Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30: 115-127.
- 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. *Mycology* 94: 722-730.
- Brooker NL, Leslie JF and Dickman MB. 1991. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81: 672-677.
- 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.
- Cai G and Schneider RW. 2004. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology* 95: 257-261.
- Chun SC and Fenn P. 2000. Selection of nitrate-noutilizing mutants of *Hypoxyton atropunctatum*, a fungal pathogen on Oak species. *Plant Pathology Journal* 16: 247-251.
- Correll JC, Klittich CJR and Leslie JF. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathology* 77: 1640-1646.
- Correll JC, Klittich CJR and Leslie JF. 1989. Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Mycological Research* 93: 21-27.
- 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.
- Dickman MB and Leslie JF. 1992. The regulatory gene nit-2 gene of *Neurospora crassa* complements a nnu mutant of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Molecular and General Genetics* 235: 458-462.
- Feng B and Marzluf GA. 1998. Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of genes. *Molecular and Cell Biology* 18: 3983-3990.
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez Alvarado G, Álvarez Hernández JC y Ochoa García M. 2006. Malformación del mango, una amenaza para el cultivo en Michoacán. *Ciencia Nicolaita* 43: 85-98.
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 1999. Use of GUS Transformants of *Fusarium subglutinans* for determining

clonalmente en áreas productoras de mango en la región central de Pacífico de México.

**Agradecimientos.** 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.

- etiology of mango malformation disease. *Phytopathology* 89: 456-461.
- Fu YH and Marzluf GA. 1990. *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa* encodes a sequence-specific DNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 87: 5331-5335.
- Ibrahim AN, Satour MM, El-Tobshy ZM and Abdel Sattar MA. 1975. Pathological and histological note on mango malformation in Egypt. *Curr. Sci.* 44:443-444.
- Kinzel JJ and Leslie JF. 1985. NADPH-dependent glutamate dehydrogenase activity in *Gibberella zeae*. *Experimental Mycology* 9: 170-173.
- Klittich CJR and Leslie JF. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118: 417-423.
- Kumar J and Beniwal SPS. 1992. Mango Malformation. Pp. 357-393. *In: Kumar J, Chaube HS, Singh US and Mukhopadaway AN., (eds.), Plant Diseases of International Importance. Disease of Fruit Crops, Vol. III. Prentice Hall, Englewood Cliffs.*
- Leslie JF. 1987. A nitrate nonutilizing mutant of *Gibberella zeae*. *Journal of General Microbiology* 133: 1279-1287.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388p.
- Lima CS, Monteiro JHA, Crespo NC, Costa SS, Leslie JF and Pfenning LH. 2009a. VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 123: 17-26.
- Lima CS, Pfenning LH, Costa MA and Leslie JF. 2009b. 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 tupaense* 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. *S. Afr. Mango Grower's Assoc. Yearb.* 10:11-12.
- Marasas WFO, Ploetz RC, Wingfield MJ, Wingfield BD and Steenkamp ET. 2006. Mango malformation disease and associated *Fusarium* species. *Phytopathology* 96: 667-672.
- Marzluf GA. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- 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, México, with traditional and integrated management. *Plant Disease* 83:223-228.
- Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon M, Ploetz RC, Aoki TA, 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 Hort.* 341:388-394.
- 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.*
- Puhalla JE. 1979. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. *Phytopathology* 69:1186-1189.
- Puhalla JE. 1985. Classification of strains of *Fusarium* on basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.
- 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 Michoacán, México. *Plant Pathology* 57:781.
- 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.
- Senghor AL, Sharma K, Kumar PL, and Bandyopadhyay R. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium tupaense* in Senegal. *Plant Disease* 96: 1582-1582.
- Steenkamp ET, Britz H, Coutinho TA, Winfield BD, Marasas WFO and Winfield MJ. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Molecular Plant Pathology* 1: 187-193.
- Summanwar AS, Raychoudhuri 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.
- Varma A, Lele VC, Raychaudhuri SP, Ram A and Sang A. 1974. Mango malformation: a fungal disease. *Phytopathologische Zeitschrift* 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.
- Zheng Q and Ploetz RC. 2002. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. Plant Pathology 51: 208-216.