

# *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA*

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

VOLUMEN 30 NÚMERO 2, 2012



Órgano Internacional de Difusión de la  
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

**La Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN-0185-3309) está incluida en ISI-Thomson Scientific Master Journal List, REDALYC, LATINDEX, AGRIS, BIOSIS, PERIODICA, Review of Plant Pathology en Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACyT.**

#### Política Editorial

La Revista Mexicana de Fitopatología (RMF) es una revista internacional que se publica semestralmente por la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF). Se distribuye a 61 bibliotecas dentro de México y 93 más en 57 países. Publica artículos de investigación original concernientes aspectos básicos y aplicados de fitopatología. Se incluyen tópicos generales relacionados con estudios de protección vegetal, así como de hongos, bacterias virus y nematodos fitopatógenos. Artículos de revisión, notas fitopatológicas, descripción de variedades y cartas al editor, también pueden someterse para su publicación. Todos los manuscritos se deben preparar en español o en inglés y enviarse al Editor en Jefe. La guía para autores se encuentra en la página de la SMF ([www.sociedadmexicanadefitopatologia.org](http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org)) y aparecerá en el primer número de cada volumen. La comunicación será exclusivamente a través del autor para correspondencia. Para su publicación, los escritos deberán ser revisados y aprobados por árbitros y editores especializados. Los trabajos publicados aparecerán en español e inglés, sin costo por la traducción. El cargo de publicación por página es de \$500 pesos mexicanos. La página a color (una o varias fotos) tiene un costo de \$750 pesos mexicanos. El costo de sobretiros o separatas adicionales es de \$50 pesos mexicanos cada uno si se ordenan más de cinco y de \$70 menos de cinco (incluye envío por correo ordinario). La suscripción anual de la RMF es de \$600 pesos individual y de \$1,000 pesos para compañía, biblioteca o institución; para extranjeros es de US\$60 individual y US\$100 para compañía, biblioteca o institución, lo cual incluye costos de envío por correo aéreo. Los manuscritos o cualquier tipo de dibujos o fotografías sometidas a la RMF y aceptados para publicación serán propiedad de la SMF.

#### Editorial Policy

The Mexican Journal of Phytopathology (MJP) is an international journal published biannually by the Mexican Society of Phytopathology, AC [Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF)]. It is distributed to 61 libraries in Mexico and 93 more in 57 countries. It publishes original research studies concerning basic and applied aspects of plant pathology. General topics included are related to plant protection studies, as well as fungi, bacteria, viruses and pathogenic nematodes. Review articles, phytopathological notes, description of varieties and letters to the editor, may also be submitted for publication. All manuscripts should be prepared in English or Spanish and sent to Editor in Chief. The Author's Guide can be found on the SMF webpage ([www.sociedadmexicanadefitopatologia.org](http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org)) and will appear in the first issue of each volume. Communication will be exclusively through the corresponding author. For its publication, the manuscripts must be reviewed and approved by specialist reviewers and editors. Published papers will appear in Spanish and English at no cost for the translation. The publication charge per page is \$500 pesos. Color pages (one or more photos) cost \$750 pesos. The cost of additional reprints is \$50 pesos if you order more than five and \$70 pesos for less than five (includes shipping by regular mail). Annual subscription to the journal is \$600 pesos for individuals and \$1,000 pesos for companies, libraries or institutions; the charge to foreigners is USD\$60 for individuals and USD\$100 for companies, libraries or institutions, which includes airmail shipping. Manuscripts or any type of drawings, photographs or slides submitted to the MJP and accepted for publication are property of the SMF.

Correspondencia: Carretera México-Texcoco, km. 36.5, Montecillo, Texcoco, C.P. 56230, Edo. de México.  
Teléfono/Fax: (595) 9520200; correo y página de la SMF: [revmexfitopatologia@prodigy.net.mx](mailto:revmexfitopatologia@prodigy.net.mx),  
<http://sociedadmexicanadefitopatologia.org/>

**Revista Mexicana de Fitopatología**  
**Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C.**

**Editor en Jefe (Editor in Chief)**

Dr. Gustavo Mora Aguilera. Colegio de Postgraduados.

**Editor Técnico (Technical Editor)**

Lic. Ivonne Aracely Sáenz Ortega. RMF.

**Editores Adjuntos (Senior Editors)**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía. UMSNH.

Dra. Emma Zavaleta Mejía. Colegio de Postgraduados.

Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez. Universidad Autónoma de Sinaloa, ESAVF.

M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes. UNAM, México.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP.

**Comité Editorial Internacional (International Editorial Advisory Board)**

Dr. R. Kenneth Horst. Cornell University, USA.

Dr. Eduardo R. French. Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú

Dr. Rodrigo Valverde. Louisiana State University, USA.

Dr. Charles L. Wilson. USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA.

Dr. André Lévesque. Agriculture and Agri-Food, Canada.

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España.

Dr. Terence L. Robinson. Cornell University, USA.

Dr. Kenneth Evans. Rothamsted Research, UK.

Dr. Louis K. Prom. USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA.

Dra. Liliana Aragón Caballero. Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú.

Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana. Auburn University, USA.

Dra. Anna Maselli. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela.

**Editores Asociados (Associate Editors)**

Dra. Irasema Del Carmen Vargas Arispuro. CIAD.

Dra. Rosa H. Manzanilla López. Rothamsted Research, UK.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada. CIAD.

Dra. Hilda Victoria Silva Rojas. Colegio de Postgraduados.

Dra. Laura Leticia Barrera Necha. CEPROBI-IPN.

Dr. Mario Rocha Peña. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Dr. Isidro Humberto Almeyda León. INIFAP-CIRNO.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP-CIRNO.

Dr. Rodolfo Velázquez Valle. UNAM, México.

Dr. Miguel Apodaca Sánchez. ESAVF.

Dr. Noé Ruiz García. Universidad del Mar, Oaxaca.

Dr. José Luciano Morales García. Universidad Autónoma Chapingo.

Dr. Juan Velázquez Mendoza. Colegio de Postgraduados.

Dr. Enrique González Pérez. Colegio de Postgraduados.

Dr. Romulo García Velasco. UAEM, Tenancingo.

Dr. Sami Jorge Michereff. Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz. UNAM, México.

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGIA

Volumen 30, número 2, 2012

---

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Scientific articles)

**Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol** {Isolation and Parasitic Potential of a *Pochonia chlamydosporia* Native Isolate Against *Nacobbus aberrans* in Beans}. Franco Navarro, F., Cid del Prado Vera, I. y Romero Tejada, M. de la L.

***Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México** {*Fusarium mexicanum* Causal Agent of Mango Malformation in Jalisco, Mexico}. Betancourt Resendes, I., Velázquez Monreal, J. J., Montero Castro, J. C., Fernández Pavía, S. P., Lozoya Saldaña, H. y Rodríguez Alvarado, G.

**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}. Rodríguez Alvarado, G., Betancourt Resendes, I., Rodríguez Fernández, R., Velázquez Monreal, J. J., Fernández Pavía, S. P. y Gómez Dorantes, N.

**Detección de Infecciones Mixtas Causadas por Begomovirus y Curtovirus en Plantas de Chile para Secado en San Luis Potosí, México** {Detection of Mixed Infections Caused by Begomovirus and Curtovirus in Chili pepper for drying plants in San Luis Potosi, Mexico}. Reveles Torres, L. R., Velásquez Valle, R., Mauricio Castillo, J. A. y Salas Muñoz, S. 155

**Localización *In Situ* de Inclusiones del Virus Tristeza de los Cítricos con Anticuerpos Desarrollados Contra la Proteína Recombinante no Estructural p20** {*In Situ* Localization of *Citrus tristeza virus* Inclusion Bodies with Antibodies Developed to the Recombinant p20 Non-Structural Protein}. Iracheta Cárdenas, M. M., Salazar Martínez, S. J., Cárdenas Ávila, M. L. y Rocha Peña, M. A. 161

## INFORMACIÓN PARA AUTORES

**Guía para Autores**  
**Guide for Authors** 128

## NOTAS FITOPATOLÓGICAS (Phytopathological notes)

**Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México** {Fungi Associated to Blueberry Foliage in Los Reyes, Michoacan, Mexico}. Mondragón Flores, A., López Medina, J., Ochoa Ascencio, S. y Gutiérrez Contreras, M. 141

**Diversidad de Hongos en Semilla de Trigo de Temporal** {Diversity of Fungi in Grain of Wheat of Temporary}. Sandoval Martínez, E., Leyva Mir, S. G., Villaseñor Mir, H. E., Rodríguez García M. F. y Mariscal Amaro, L. A. 145

**Efecto de la Preparación del Suelo en la Dispersión de Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk** {Effect of Soil Preparation in Dispersion of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk}. Velásquez Valle, R., Reveles Hernández, M., Medina Aguilar, M. M. y Amador Ramírez, M. D. 150

# Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol

## Isolation and Parasitic Potential of *Pochonia chlamydosporia* Against *Nacobbus aberrans* on Bean

Francisco Franco Navarro, Ignacio Cid del Prado Vera y María de la Luz Romero Tejeda, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. Correspondencia: ffranco@colpos.mx

(Recibido: Octubre 24, 2011 Aceptado: Abril 10, 2012)

Franco Navarro, F., Cid del Prado Vera, I. y Romero Tejeda, M. de la L. 2013. Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 30:101-114

**Resumen.** Se tomaron muestras en suelos naturalmente infestados con *Nacobbus aberrans* dentro del municipio Pozo de Gamboa, estado de Zacatecas, México, y se obtuvo un aislamiento nativo del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Se realizaron pruebas para determinar su potencial como agente de control biológico del nematodo: primero su capacidad de colonización de raíces, tanto de plantas empleadas en esquemas de rotación como de diferentes variedades de frijol, y posteriormente su capacidad para parasitar huevos de *N. aberrans in vitro*. También se probó su efectividad como biocontrolador del nematodo bajo condiciones de invernadero. El aislamiento nativo colonizó el 100 % de raíces de las plantas probadas y de las variedades de frijol utilizadas; el parasitismo de huevos fue del 82 %. En invernadero, las plantas de frijol inoculadas con dos dosis diferentes del aislamiento nativo (7,500 y 15,000 clamidosporas g<sup>-1</sup> de suelo) desarrollaron mayor follaje y peso de raíces que las plantas testigo y las tratadas con carbofuran 48 % (4 L ha<sup>-1</sup>). El agallamiento de raíces y el número de nematodos dentro de las mismas fueron menores al aplicarse el hongo. Este es el primer reporte de *P. chlamydosporia* en el estado de Zacatecas y de su uso como potencial agente de control biológico del nematodo falso nodulador en frijol.

Palabras clave adicionales: control biológico de nematodos, hongos nematófagos, nematodo falso nodulador, *Phaseolus vulgaris*.

El hongo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams (= *Verticillium chlamydosporium*) es un parásito facultativo de huevos de nematodos ampliamente

**Abstract.** Naturally infested with *Nacobbus aberrans* soil samples were taken at Pozo de Gamboa municipality, Zacatecas state, Mexico, and native isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* were obtained. Tests to evaluate their potential as a biological control agent against this nematode were done: first, their root colonization capacity was evaluated both from plants used in rotation schemes as well as of different bean varieties, and also their ability to parasitize *N. aberrans* eggs *in vitro* was tested. Additionally, tests were done to prove their effectiveness as a nematode biocontroller under greenhouse conditions. The native isolate colonized 100 % of the roots of the plants and the bean varieties tested; egg parasitism was 82 %. Greenhouse bean plants inoculated with two different doses of the native isolate (7,500 and 15,000 chlamydosporas g<sup>-1</sup> of soil) showed more foliage and root weight than the control plants and those treated with 48 % carbofuran (4 L ha<sup>-1</sup>). Root galling and nematode numbers inside them were lower after fungus application. This is the first report of *P. chlamydosporia* in Zacatecas state and its use as a potential biological control agent for false root - knot nematode in beans.

**Additional keywords:** biological control of nematodes, nematophagous fungi, false root-knot nematode, *Phaseolus vulgaris*.

The fungus *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams (= *Verticillium chlamydosporium*) is a facultative parasite of nematode eggs widely distributed. It is found in soil where it can survive feeding from organic matter, but it can also grow and develop in the egg masses deposited by the female root-knot nematodes. Furthermore, this fungus has the ability to colonize the rhizoplane and rhizosphere (Bourne *et al.* 1994; De Leij and Kerry, 1991, Hirsch *et al.*, 2001), it can be root endophyte (Bordallo *et al.*, 2002, Lopez *et al.*, 2002) and even reduce colonization and damage by fungal pathogens (Monfort *et al.*, 2005) in several

distribuido. Se encuentra en suelo donde puede sobrevivir alimentándose de materia orgánica, pero también puede crecer y desarrollarse en las masas de huevos depositadas por la hembra de los nematodos agalladores. Además, este hongo tiene la capacidad de colonizar el rizoplasma y la rizósfera (Bourne *et al.*, 1994; De Leij y Kerry, 1991; Hirsch *et al.*, 2001), ser endófito de raíz (Bordallo *et al.*, 2002; López *et al.*, 2002) e incluso reducir la colonización y daño por parte de hongos fitopatógenos (Monfort *et al.*, 2005) en varios cultivos de importancia económica, ello sin causar lesiones o afectar su crecimiento. El hecho de que pueda colonizar raíces y aplicarse al suelo en forma de suspensión de clamidosporas o bien, en sustrato sólido previamente colonizado, le permite al hongo multiplicarse cerca de las hembras en desarrollo, invadir la masa de huevos e infectar estos últimos reduciendo eventualmente las poblaciones de los nematodos (Bourne *et al.*, 1996; De Leij y Kerry, 1991; Vianene y Abawi, 2000) y en consecuencia el impacto negativo de éstos en sus plantas hospedantes. Por tal motivo, *P. chlamydosporia* ha sido reconocido a nivel mundial como un potencial agente de control biológico de nematodos formadores de quistes (Kerry *et al.*, 1984), nematodos agalladores (Atkins *et al.*, 2003b; De Leij *et al.*, 1993; Ebadia *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry e Hidalgo, 2004; Sorribas *et al.*, 2003), e incluso de *Rotylenchulus reniformis* (Wang *et al.*, 2005). Este hongo ha sido aislado en México, principalmente en zonas donde se cultiva jitomate y algunas áreas naturales del trópico mexicano (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009), y ha probado ser un potencial agente de control biológico del nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen, en jitomate y chile (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007, 2011).

*Nacobbus aberrans sensu* Sher es una de las especies de nematodos fitopatógenos de mayor importancia en México, debido al daño y las pérdidas que ocasiona en varias plantas cultivadas como chile (*Capsicum annum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cristóbal *et al.*, 2001a). En el caso del frijol, alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, se ha estimado que las pérdidas debidas al nematodo pueden alcanzar un 36 % del valor de la producción, principalmente en variedades como Negro Puebla y Canario (Manzanilla *et al.*, 2002). Las estrategias de control del nematodo, incluida la aplicación de nematicidas, no han sido satisfactorias; además, el uso de nematicidas tiene un costo elevado, no sólo desde el punto de vista económico sino también por sus efectos nocivos tanto al ambiente como a la salud humana (Pérez *et al.*, 2007).

Considerando la importancia que el nematodo falso nodulador tiene en varias zonas productoras de frijol del estado de Zacatecas, la actual tendencia en la búsqueda de alternativas sustentables para el control de nematodos fitoparásitos, y que el control biológico con organismos antagonistas no se ha probado en el patosistema *N. aberrans*-frijol, se plantearon los siguientes objetivos: 1) obtener aislamientos nativos de *P. chlamydosporia* en varias localidades del estado de Zacatecas donde *N. aberrans* está presente en frijol, y 2) probar el potencial como agente de

económicamente importantes, sin causar daño o afectar su crecimiento. El hecho de que puede colonizar raíces y puede ser aplicado al suelo como suspensión de clamidosporas, o en un sustrato previamente colonizado, permite al hongo multiplicarse cerca de las hembras en desarrollo, invadir la masa de huevos e infectar estos últimos reduciendo eventualmente las poblaciones de los nematodos (Bourne *et al.*, 1996; De Leij y Kerry, 1991; Vianene y Abawi, 2000) and, therefore, their negative impact on host plants. *P. chlamydosporia* has been recognized worldwide as a potential biological control agent against cyst-forming nematodes (Kerry *et al.*, 1984), root-knot nematodes (Atkins *et al.*, 2003b; De Leij *et al.*, 1993; Ebadia *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry and Hidalgo, 2004; Sorribas *et al.*, 2003), and even against *Rotylenchulus reniformis* (Wang *et al.*, 2005). This fungus has been isolated in Mexico, mainly in tomato growing areas and in some natural areas of the Mexican tropics (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009), and it has proven to be a potential biological control agent of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen, present in tomato and chili plants (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007, 2011).

One of the pathogenic nematode species of major importance in Mexico is *Nacobbus aberrans sensu* Sher because of the damage and the losses it causes in several crop plants such as chili (*Capsicum annum* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Cristóbal *et al.*, 2001a). In the case of beans, main food in the diet of Mexican population, it has been estimated that losses due to this nematode can reach up to 36 % of the production value, mainly in Negro Puebla and Canario bean varieties (Manzanilla *et al.* 2002). The nematode control strategies, including the use of nematicides, have not been satisfactory; in addition, the use of nematicides is costly, not only from the economic point of view but also for its harmful effects to both the environment and human health (Pérez *et al.*, 2007).

Considering the importance that this false-knot nematode has in several bean growing areas of Zacatecas state, the current trend in the search of sustainable alternatives for the control of plant parasitic nematodes, and that the biological control with antagonistic organisms has not been tested in the *N. aberrans*-beans pathosystem, the aims of this study were: 1) to obtain native *P. chlamydosporia* isolates from several Zacatecas state locations where *N. aberrans* is present in beans, and 2) to test the isolate obtained as a potential biological control agent on the false root-knot nematode and then contribute in finding alternatives for effective and sustainable control of this nematode.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample collection.** Sampling sites in Zacatecas were selected based on a history of the presence and impact of *N. aberrans* in the area and on the aerial and underground observation of symptoms caused by the nematode in bean plants. The sample collection was conducted in the summer of 2009 on three land crops of the Municipality of Panuco, Zacatecas; one was located in Pozo de Gamboa (22.95 ° Lat

control biológico del aislamiento obtenido sobre el nematodo falso nodulador y así contribuir en la búsqueda de alternativas para el control eficaz y sustentable de este nematodo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de muestras.** En Zacatecas, los sitios de muestreo se seleccionaron con base en los antecedentes de la presencia e impacto de *N. aberrans* en la zona y en la observación de síntomas tanto aéreos como subterráneos ocasionados por el nematodo en plantas de frijol. La colecta de muestras se llevó a cabo en el verano de 2009 en tres predios del Municipio de Pánuco, Zacatecas; uno ubicado en Pozo de Gamboa (22.95 ° Lat N, 102.57 ° Long O; 2250 msnm) y los otros dos aproximadamente a 9 km de éste, ambos (India 1 e India 2) localizados en La India (22.99 ° Lat N, 102.55 ° Long O; 2180 msnm).

En cada predio se tomaron 30 muestras de suelo y de raíces. El suelo se colectó en la periferia de las raíces, tomando muestras de 200 g de suelo entre los 15 y 25 cm de profundidad. En cuanto a las raíces, se tomaron aproximadamente 60 g en cada punto donde se colectó suelo y se revisó que éstas estuvieran agalladas (más del 80 % del sistema de raíces). Cada muestra se colocó por separado en bolsas de plástico etiquetadas y se conservaron frescas hasta su traslado al laboratorio para su procesamiento.

**Aislamiento del hongo.** Con el fin de obtener uno o más aislamientos nativos de los predios muestreados, se procesaron por separado suelo, raíces agalladas y también masas de huevos del nematodo siguiendo los protocolos descritos por Kerry (1997) y utilizando medio selectivo a base de Papa-Agar con antibióticos (PAA) (Hidalgo *et al.*, 2000). Para la detección a partir de suelo y de raíces agalladas de cada localidad, se procesaron 10 muestras de 1 g, de las cuales se hicieron dos diluciones ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) y 200 µL de cada una se colocaron en medio selectivo; en el caso de las raíces, cada gramo de raíz se maceró previamente antes de preparar la dilución. Una vez sembradas las cajas, éstas se incubaron a 27 °C durante tres semanas (Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2007). La detección del hongo a partir de masas de huevos se llevó a cabo tomando masas extraídas de raíces agalladas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 2.0 % por 30 s; posteriormente, las masas se enjuagaron con tres lavados de agua destilada esterilizada durante 1 min cada uno y se colocaron 20 masas por cada placa Petri con PAA. Las placas se incubaron durante 4 d a 27 °C para luego revisar el crecimiento o no del hongo a partir de los huevos.

Una vez que se detectaron colonias que por su crecimiento en medio selectivo se identificaron como *Pochonia*, y con base en experiencias previas, éstas se transfirieron sobre PAA y se incubaron durante 10 d a 27 °C para observar el crecimiento característico de la colonia (Hidalgo *et al.*, 2000). Las cajas se revisaron directamente en un microscopio compuesto a 400 aumentos para corroborar la producción de conidios y dictioclamidosporas que caracterizan al género y a la especie. El hongo se identificó morfológicamente de acuerdo a las descripciones de Gams y Zare (2001), Kerry (1997) y Zare *et al.* (2001).

N, 102.57 ° Long W, 2250 masl) and the other two lands were about 9 km away from the first one, both (India 1 and India 2) were located at La India (22.99 ° Lat N, 102.55 ° Long W; 2180 masl).

From each land, 30 soil and roots samples were collected. The soil was collected from around the roots by sampling 200 g of soil at 15 to 25 cm of depth. As for the roots, approximately 60 g were taken at each point where soil was collected and it was observed that they were galled (over 80 % of the root system). Each sample was placed separately in labeled plastic bags and kept cool until transportation to the laboratory for processing.

**Fungus isolation.** In order to obtain one or more native isolates from each land crop sampled, the soil, galled roots and nematode egg masses were separately processed following the protocols described by Kerry (1997) and using selective medium based on Potato-Agar with antibiotics (PAA) (Hidalgo *et al.*, 2000). For detection from soil and galled roots of each locality, 10 samples of 1 g each were processed; two dilutions ( $10^{-1}$  and  $10^{-2}$ ) were done for each sample and 200 µL were placed on selective medium; in the case of roots, each root gram was previously macerated before preparing the dilution. Once the Petri dishes were ready, they were incubated at 27 °C during three weeks (Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000 Perez *et al.*, 2007). Fungus detection in egg masses was achieved using masses extracted from galled roots and disinfected with a 2.0 % sodium hypochlorite solution during 30 s; then masses were rinsed with three washes of sterile distilled water during 1 min each and 20 masses per each Petri dish with PAA were placed. The plates were incubated during 4 d at 27 °C in order to study the fungus growth from eggs.

Once colonies were detected and that by their growth on selective medium were identified as *Pochonia*, they were transferred to PAA and incubated during 10 d at 27 °C (based on previous experiences) to observe the characteristic growth of the colony (Hidalgo *et al.*, 2000). The plates were observed directly with a compound microscope at 400x to corroborate conidia and dictioclamyospore production that characterize the genus and species. The fungus was identified morphologically according to descriptions of Gams and Zare (2001), Kerry (1997) and Zare *et al.* (2001). Later on, it was transferred to PAA plates in order to have enough material for the following tests. Some 21 d old plates with previously identified isolate were kept in test tubes with PAA and mineral oil, and at deep freezing at -80 °C in 25 % sterile glycerol as storage medium.

**Parasitic potential evaluation.** In order to evaluate the potential as biocontrol agent of the *P. chlamydosporia* isolate obtained from soil, three tests were conducted for this purpose: root colonization, parasitism of nematode eggs *in vitro* conditions and its effectiveness as a biological control agent under greenhouse conditions (De Leij and Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000) that have also been applied in previous studies with other Mexican isolates (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2007).

**Root colonization tests.** The cultures tested, used in some cases as part of the rotation cycles in the Zacatecas state, were grouped based on their susceptibility degree to *N.*

Posteriormente, se transfirió a placas de PAA con el fin de contar con suficiente material para las siguientes pruebas. Algunas placas de 21 d de edad del aislamiento identificado previamente, se utilizaron para preservarlo en tubos con medio PAA y aceite mineral, así como en ultracongelación a -80 °C en glicerol 25 % esterilizado como medio de almacenaje.

**Evaluación del potencial parasítico.** Para evaluar el potencial del aislamiento de *P. chlamydosporia* obtenido a partir de suelo, como agente de control biológico, se realizaron tres pruebas para tal fin: la colonización de raíces, el parasitismo de huevos del nematodo en condiciones *in vitro*, y su efectividad como agente de control biológico en condiciones de invernadero (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000); estas pruebas han sido aplicadas en estudios previos con aislamientos mexicanos (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007).

**Pruebas de colonización de raíces.** Los cultivos probados, empleados en algunos casos como parte de los ciclos de rotación en el estado de Zacatecas, se agruparon con base en su grado de susceptibilidad a *N. aberrans* en hospedantes (jitomate y chile), hospedantes pobres (calabaza y tomate de cáscara), y no hospedantes (maíz, col y brócoli) (datos no publicados). También se probaron variedades de frijol mejoradas con diferente grado de susceptibilidad al nematodo: Bayo INIFAP y Flor de Mayo criollo (susceptibles), Flor de Mayo M-38 (tolerante) y Bayo Mecentral (resistente) (Hernández, 2001).

Con el fin de evaluar la capacidad del aislamiento obtenido para colonizar las raíces de las plantas antes mencionadas, se siguió la metodología de Franco *et al.* (2009). Las semillas de dichas plantas se sumergieron en agua destilada estéril durante 10 min y luego 1 min en una solución de hipoclorito de sodio 8 % en agitación constante; finalmente, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril durante 1 min y hasta eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Las semillas se distribuyeron sobre papel absorbente contenido en una caja de Petri esterilizada, se humedecieron con agua destilada estéril y se incubaron a 27 °C durante ocho días para el caso de semillas grandes (maíz, frijol y calabaza) y doce días para semillas pequeñas (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli). A la par de la germinación de las semillas, se llenaron tubos de ensaye (20 x 3 cm), con 70 g de vermiculita humedecida y estéril. Los tubos se dejaron enfriar y en cada uno de ellos, por debajo de la superficie, se colocaron tres círculos de medio PAA de 1 cm de diámetro con el aislamiento de *P. chlamydosporia* (IZ1) de aproximadamente 20 d de edad; los círculos se tomaron de la zona más externa de la colonia (zona de crecimiento). Otro lote igual de tubos se sembró con el aislamiento mexicano de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* SC1, el cual sirvió como referencia para esta prueba. Dicho aislamiento está depositado en la colección de *Pochonia chlamydosporia* del Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (Estado de México, México) y cuya capacidad colonizadora de raíces, parasitismo de huevos de *N. aberrans* y efectividad biológica han sido probados en ensayos tanto en invernadero como en campo (Flores *et al.*,

*aberrans* in hosts (tomato and chili), poor hosts (squash and tomatillo) and non-host (corn, cabbage and broccoli) (unpublished data). Also improved bean varieties with different degrees of susceptibility to the nematode were tested: Bayo INIFAP and Flor de Mayo creole (susceptible), Flor de Mayo M-38 (tolerant) and Bayo Mecentral (resistant) (Hernández, 2001).

In order to evaluate the ability of the obtained isolate to colonize the roots of the plants specified above, the methodology by Franco *et al.* (2009) was followed. Seeds from these plants were immersed in sterile distilled water during 10 min and then 1 min in 8 % sodium hypochlorite solution under constant stirring; lastly, the seeds were rinsed with sterile distilled water during 1 min until excess sodium hypochlorite was removed. The seeds were spread on paper towels in a sterile Petri dish, they were moistened with sterile distilled water and incubated at 27 °C during eight days for large seeds (corn, beans and squash) and twelve days for small seeds (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli). Along with the germination of the seeds stage, test tubes (20 x 3 cm) were filled with 70 g of moistened and sterilized vermiculite. The tubes were allowed to cool and on each of them three circles of 1 cm diameter of PAA media with the *P. chlamydosporia* isolate (IZ1) approximately 20 d old were placed; the circles were taken from the outermost zone of the colony (growth zone). A similar tubes batch was plated with Mexican isolate of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* SC1, which served as a reference for this test. This isolate is deposited in the *Pochonia chlamydosporia* collection of the Phytopathology Program, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (State of Mexico, Mexico) and whose root colonizing ability, *N. aberrans* egg parasitism and biological effectiveness have been already tested under both greenhouse and field conditions (Flores *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2011).

Two germinated seeds of corn, beans and squash were placed on each tube, or three for small seeds (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli). For each crop and fungal isolate, three replicates were done. All tubes were incubated at 25 °C during one week (corn, beans and squash) and up to two weeks for the rest of the plants, depending on the germination and growing time. After incubation under sterile conditions, plants were removed from each tube and excess vermiculite was removed, roots were cut into 1 cm segments (corn, beans and squash) or 0.5 cm (tomato, pepper, tomatillo, cabbage and broccoli), mixed (considering equally proximal and distal parts of the roots) and plated in Petri dishes with PAA; roots segments were incubated during seven days at 27 °C. For each tube or repetition, three Petri dishes with 10 root segments were plated. After seven incubation days, the boxes were observed directly under a compound microscope at 400x to corroborate the colonization of the isolates tested. Furthermore, the number of colonized segments was quantified and the percentage of colonization was then calculated (Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000).

**Parasitism of *N. aberrans* eggs.** In order to carry out this test, the previously mentioned isolates *P.*



2007; Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011).

En cada tubo se colocaron dos semillas germinadas de maíz, frijol y calabaza, o tres para semillas pequeñas (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli). Para cada cultivo, y aislado fúngico, se tuvieron tres réplicas. Todos los tubos se incubaron a 25 °C durante una semana (maíz, frijol y calabaza) y hasta dos semanas para el resto de las plantas, ello en función del tiempo que tardaron en germinar y desarrollarse. Luego del período de incubación en condiciones estériles, se sacaron las plantas de cada tubo, se les removió el exceso de vermiculita, se cortaron las raíces en segmentos de 1 cm (maíz, frijol y calabaza) o 0.5 cm (jitomate, chile, tomate de cáscara, col y brócoli), se mezclaron (para considerar por igual partes proximales y distales de la raíces), y se sembraron en cajas de Petri con PAA para luego incubarlas durante siete días a 27 °C. Por cada tubo o repetición, se sembraron tres cajas de Petri con 10 segmentos de raíz. Transcurridos los siete días de incubación, las cajas se revisaron directamente en un microscopio compuesto a 400 aumentos para corroborar la colonización por parte de los aislamientos probados. Además, se cuantificó el número de segmentos colonizados y se calculó así el porcentaje de colonización (Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000).

**Parasitismo de huevos de *N. aberrans*.** Para llevar a cabo esta prueba, se emplearon nuevamente los dos aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* antes referidos (IZ1 y SC1) y se siguió la metodología propuesta por Hidalgo *et al.* (2000). Ambos aislamientos se mantuvieron durante 21 d en medio PAA, tiempo después del cual se les colocaron 5 mL de agua destilada estéril, se raspó la superficie con una varilla de vidrio y se obtuvo una suspensión de material fúngico (conidios y fragmentos miceliales). En cada caso, se tomaron alícuotas de 0.2 mL de la suspensión y se dispersaron uniformemente sobre placas de Petri con Agua-Agar y antibióticos (AAA) para luego incubarlas a 25 °C durante dos días. Los huevos para la prueba se obtuvieron a partir de masas extraídas de plantas de frijol infectadas por una de las poblaciones de *N. aberrans* proveniente de Zacatecas (La "India 2"), las cuales se mantuvieron en el invernadero del Área de Nematología Agrícola del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (temp máxima promedio = 29.6 °C; temp mínima promedio = 6.1 °C; humedad relativa promedio = 20.5 %). Las masas de huevos colectadas se disgregaron utilizando jeringas de insulina para liberar los huevos de la masa gelatinosa. Una alícuota de 1 mL (aproximadamente 300 huevos) se colocó en cada una de las cajas previamente sembradas con los respectivos aislamientos y se incubaron a 25 °C por cuatro días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se estimó el porcentaje de parasitismo de huevos mediante el conteo al azar de 100 huevos en un microscopio compuesto a 400 aumentos. La prueba consistió de cinco réplicas por cada aislamiento más huevos. Además, se incluyó un control negativo que consistió de cinco cajas con huevos pero sin hongo.

**Prueba de efectividad sobre *N. aberrans* en condiciones de invernadero.** Los seis tratamientos que se

*chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (IZ1 and SC1) were used, as well as the methodology proposed by Hidalgo *et al.* (2000). Both isolates were maintained during 21 d in PAA medium, then 5 mL of sterile distilled water were added and the surface was scraped with a glass rod to obtain a suspension of fungal material (conidia and mycelial fragments). For each case, 0.2 mL aliquots of the suspension were uniformly dispersed on Petri plates with Water-Agar and antibiotics (WAA) and then incubated at 25 °C during two days. Eggs for tests were obtained from egg masses extracted from bean plants infected with one of the *N. aberrans* populations from Zacatecas ("India 2"), which were maintained in the greenhouse of the Department of Agricultural Nematology of the Phytopathology Program at Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo (maximum average temp= 29.6 °C; minimum average temp= 6.1°C; average relative humidity = 20.5 %). Collected egg masses were disrupted using insulin syringes to release the eggs from the gelatinous mass. A 1 mL aliquot (about 300 eggs) was placed in each of the boxes previously plated with each isolate respectively and incubated at 25 °C during four days. After incubation time, the egg parasitism percentage was estimated by randomly counting 100 eggs with a compound microscope at 400x. The test consisted of five replicates per each isolate plus eggs. Furthermore, a negative control consisting of five plates with eggs without fungus was included.

***N. aberrans* effectiveness test under greenhouse conditions.** The six treatments applied in this stage are shown in Table 1. The experimental design was completely randomized with four replications. In order to set the test conditions up as similar as those in the field, the test was carried out in 5 kg containers filled with soil from one of the previously sampled lands naturally infected with *N. aberrans sensu* Sher, located in Pozo de Gamboa town, Zacatecas; it is important to mention that in this locality *P. chlamydosporia* was not detected and the level of nematode inoculum was high (62 vermiform individuals, 21 mature females and 14 galls g<sup>-1</sup> root in average). The soil was homogenized, 4.5 kg were placed on each container and four bean seeds var. Flor de Mayo creole previously disinfected were seeded; this bean variety is susceptible to the nematode and it was used in order to increase its level of inoculum in soil prior to starting the greenhouse test. The plants were kept 40 d after sowing (maximum average temp = 30.8 °C; minimum average temp = 7.1 °C, mean relative humidity = 21.6 %) and from each container two plants were extracted in order to confirm the presence of the nematode and to indirectly know the inoculum level on each of them (by counting the number of galls). Once the galls of all sampled roots were counted (5-8 galls g<sup>-1</sup> root) they were again incorporated to their respective soil. As part of the test itself, again four bean seeds var. Flor de Mayo creole were planted.

The nematicide (48 % carbofuran at 4 L ha<sup>-1</sup> doses) was applied twice at the same dose, but in order make more efficient both applications and to register precisely the date of the first application, some destructive samplings were made on bean plants grown simultaneously to those of the experiment; such samplings were done every third day after

Cuadro 1. Tratamientos probados en invernadero para el control de *Nacobbus aberrans* en plantas de frijol var. Flor de Mayo Criollo crecidas en suelo naturalmente infestado.

Table 1. Treatments tested for *Nacobbus aberrans* control in bean plants var. Flor de Mayo creole grown in naturally infested soil under greenhouse conditions.

Clave	Descripción
TA	<i>N. aberrans</i> (Testigo Absoluto)
TA + V	<i>N. aberrans</i> + Vermicomposta
N	<i>N. aberrans</i> + carbofuran 48 % a dosis de 4 L ha <sup>-1</sup> (Nematicida)
SCI	<i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave SCI) a dosis de 15,000 clamidosporas g <sup>-1</sup> de suelo
IZI-7500	<i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave IZI) a dosis de 7,500 clamidosporas g <sup>-1</sup> de suelo
IZI-15000	<i>N. aberrans</i> + Vermicomposta + <i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i> (clave IZI) a dosis de 15,000 clamidosporas g <sup>-1</sup> de suelo

aplicaron en esta fase se presentan en el Cuadro 1. El diseño experimental fue completamente al azar, con cuatro repeticiones. Con el fin de establecer el ensayo en condiciones lo más parecidas a lo que sucedería en campo, éste se llevó cabo en macetas de 5 kg de capacidad que contenían suelo proveniente de uno de los predios previamente muestreados y naturalmente infestados con *N. aberrans sensu* Sher, ubicado en la localidad de Pozo de Gamboa, Zacatecas; cabe mencionar que en dicha localidad no se detectó a *P. chlamydosporia* y el nivel de inóculo del nematodo era elevado (62 individuos vermiformes, 21 hembras maduras y 14 agallas g<sup>-1</sup> de raíz en promedio). El suelo se homogeneizó y en cada maceta se vaciaron 4.5 kg para luego sembrar cuatro semillas de frijol var. Flor de Mayo criollo previamente desinfectadas; esta variedad es susceptible al nematodo y se utilizó con el fin de incrementar su nivel de inóculo en suelo antes de iniciar el ensayo en invernadero. Las plantas se mantuvieron 40 d posteriores a la siembra (temp máxima promedio = 30.8 °C; temp mínima promedio = 7.1 °C; humedad relativa promedio = 21.6 %) y de cada maceta se extrajeron dos plantas con el fin de corroborar la presencia del nematodo y conocer indirectamente el nivel de inóculo en cada una de ellas (a través del conteo de agallas). Una vez contadas las agallas de todas las raíces muestreadas (5-8 agallas g<sup>-1</sup> de raíz), éstas se incorporaron nuevamente a su respectivo suelo. Como parte propiamente del ensayo, en cada una de los macetas se sembraron nuevamente cuatro semillas de frijol var. Flor de Mayo criollo.

El nematicida (carbofuran 48 % a dosis de 4 L ha<sup>-1</sup>) se aplicó en dos ocasiones a la misma dosis, pero para hacer más eficientes ambas aplicaciones y saber la fecha de la primera aplicación, se hicieron muestreos destructivos de plantas de frijol mantenidas a la par de las del experimento; dichos muestreos se realizaron cada tercer día luego de la aparición de las primeras hojas verdaderas. Este monitoreo del nematodo se realizó debido al conocimiento que ya se tiene de la capacidad de sobrevivencia de los estadios biológicos del nematodo (Cristóbal *et al.*, 2001b) y con el fin de saber el momento idóneo para la aplicación del nematicida. Una vez detectados los nematodos por métodos convencionales (en suelo), se estableció la fecha de la

the appearance of the first true leaves. This nematode monitoring was achieved based on those previous studies about survivability of biological stages of the nematode (Cristóbal *et al.*, 2001b) and it was done with the aim to detect the right time for the nematicide application. Once the nematodes were detected by conventional methods (in soil), the date of first application of the nematicide was established (10 d after the emergence of the first true leaves), and the second two weeks later (Pérez *et al.*, 2011).

Both isolates were massively spread on cracked corn (Perez *et al.*, 2007) and applied to the corresponding treatments in two doses (Table 1). Before application of the isolates, quality tests were done to the cracked corn used as substrate for fungus propagation. The tests were: number of chlamydo spores and Colony Forming Units (CFU) g<sup>-1</sup> colonized corn, as well as chlamydo spores germination percentage; for these tests the protocols described by Noble *et al.* (2000) and Kerry (1997) were followed. Chlamydo spores number g<sup>-1</sup> colonized corn for SC1 isolate was 5.0 x 10<sup>6</sup>, while for the IZ1 isolate it was 5.4 x 10<sup>6</sup>. Total UFC g<sup>-1</sup> colonized corn for SC1 isolate was 6.76 x 10<sup>6</sup> and for IZ1 isolate it was 6.05 x 10<sup>6</sup>. Lastly, the chlamydo spores germination percentage for the SC1 isolate was 80% and 76 % for IZ1 isolate.

Once the amount of chlamydo spores g<sup>-1</sup> of colonized corn for each isolate was known, the amount of colonized substrate needed in the different treatments was estimated. For SC1 isolate, 10 g of cracked corn colonized per repetition were applied, while for IZ1 isolate 10.8 g of cracked corn colonized per repetition for the low dose and 21.6 g per replicate for the high dose were applied, these were equivalent to 7500 and 15000 chlamydo spores g<sup>-1</sup> soil, respectively (Table 1) (Perez *et al.*, 2007 and 2011). In order to apply the colonized substrate, vermicompost produced from goat manure as a vehicle application was used; the reference dose was 15 t ha<sup>-1</sup> (52 g pot<sup>-1</sup>). In one of the treatments only vermicompost was applied (Table 1) in order to follow the effect of the fertilizer on the bean plants without the fungus presence. All treatments, except for the nematicide application, were applied one week after sowing, since the bean plants were already germinated and there were roots ready for fungus colonization. The

primera aplicación del nematicida (10 d posteriores a la aparición de las primeras hojas verdaderas), y la segunda dos semanas después (Pérez *et al.*, 2011).

Ambos aislamientos utilizados se propagaron masivamente sobre maíz quebrado (Pérez *et al.*, 2007) y se aplicaron en los tratamientos correspondientes en dos dosis (Cuadro 1). Antes de la aplicación de los aislamientos, se realizaron pruebas de calidad al maíz quebrado colonizado que se utilizó como sustrato de propagación del hongo. Las pruebas fueron: número de clamidosporas y unidades formadoras de colonias (UFC)  $g^{-1}$  de maíz colonizado, así como el porcentaje de germinación de clamidosporas; para éstas se siguieron los protocolos descritos por Hidalgo *et al.* (2000) y Kerry (1997). El número de clamidosporas  $g^{-1}$  de maíz colonizado para el aislamiento SC1 fue de  $5.0 \times 10^6$ , en tanto que para el aislamiento IZ1 fue de  $5.4 \times 10^6$ . El total de UFC  $g^{-1}$  de maíz colonizado del aislamiento SC1 fue de  $6.76 \times 10^6$  y el del aislamiento IZ1 fue de  $6.05 \times 10^6$ . Finalmente, el porcentaje de germinación de clamidosporas correspondientes al aislamiento SC1 fue del 80 %, mientras que para el aislamiento IZ1 fue del 76 %.

Una vez conocida la cantidad de clamidosporas  $g^{-1}$  de maíz colonizado por cada aislamiento, se estimó la cantidad de sustrato colonizado a utilizar en los diferentes tratamientos. Del aislamiento SC1 se aplicaron 10 g de maíz quebrado colonizado por repetición, mientras que del aislamiento IZ1 se aplicaron 10.8 g de maíz quebrado colonizado por repetición para la dosis baja y 21.6 g por repetición para la dosis alta, equivalentes a 7500 y 15000 clamidosporas  $g^{-1}$  de suelo, respectivamente (Cuadro 1) (Pérez *et al.*, 2007 y 2011). Para aplicar el sustrato colonizado, se utilizó vermicomposta elaborada a base de estiércol de cabra como vehículo de aplicación; la dosis referencia fue de  $15 t ha^{-1}$  ( $52 g maceta^{-1}$ ). En uno de los tratamientos sólo se aplicó vermicomposta (Cuadro 1) con el fin de establecer el efecto único del abono en las plantas de frijol sin la presencia del hongo. Todos los tratamientos, a excepción de la aplicación del nematicida, se aplicaron una semana después de la siembra, toda vez que las plantas de frijol ya habían germinado y había raíces para colonizar por parte del hongo. El sustrato colonizado y la vermicomposta se incorporaron al suelo, mientras que el nematicida se aplicó al cuello de cada planta.

Se vigiló que el suelo se mantuviera húmedo durante el transcurso del experimento y se aplicó fertilización foliar a las plantas cada 20 d durante el período vegetativo (Bayfolan® Forte a dosis de  $1.5 mL L^{-1}$  de agua). A los 60 d posteriores a la siembra del frijol (temp máxima promedio =  $34.3 ^\circ C$ ; temp mínima promedio =  $8.2 ^\circ C$ ; humedad relativa promedio: 25.8 %), en las plantas se cuantificó el peso seco del follaje mediante el secado de la parte aérea de cada planta dentro de bolsas de papel en una estufa a  $40 ^\circ C$  por 72 h. También se cuantificó el peso fresco de las raíces y se calculó el índice de agallamiento, que se obtuvo mediante el cociente del número de agallas entre el peso fresco de raíces y se utilizó para tener una medida más precisa del daño del nematodo en las raíces (Pérez *et al.*, 2011). Además, se contó el número de individuos de los juveniles de tercer ( $J_3$ ) y cuarto estadio ( $J_4$ ), y el de hembras maduras  $g^{-1}$  de raíz; para

colonized substrate and vermicompost were incorporated into the soil, while the nematicide was applied by ground.

Soil was wet during all the experiment and foliar fertilization was applied to the plants every 20 d during the growing season (Bayfolan® Forte,  $1.5 mL L^{-1}$  of water). After 60 d of bean sowing (maximum temp average =  $34.3 ^\circ C$ ; minimum temp average =  $8.2 ^\circ C$ , average relative humidity: 25.8 %), the foliage dry weight was quantified by drying the aerial part of each plant inside paper bags in an oven at  $40 ^\circ C$  during 72 h. Also the root fresh weight was quantified and the galling index was calculated; this was obtained by the ratio of the galls number and the fresh roots weight, and it was used to have a more accurate measure of nematode damage in roots (Pérez *et al.*, 2011). In addition, the number of individuals of third ( $J_3$ ) and fourth stage ( $J_4$ ) were counted, as well as the number of mature females  $g^{-1}$  of root; for this purpose, three root samples were liquefied (1 g each) (Ayoub, 1977) and another three samples (1g each) previously stained with acid fuchsin were screened (Byrd *et al.*, 1983). Fungal CFU were quantified both in root and soil at the end of the experiment in order to confirm its presence and then associate the observed effects (Kerry, 1997 Pérez *et al.*, 2007, 2011).

**Statistical Analysis.** The data obtained from the measured variables were subjected to a variance analysis and when significant differences between treatments were detected, the media comparison using the Tukey test ( $P < 0.05$ ) was done. For this purpose, Statistical Analysis System® software for Windows V8 was used.

## RESULTS

**Search of native isolates.** From the soil and root samples collected in Zacatecas, as well as from the *N. aberrans* egg masses, only one isolate from soil was obtained, which corresponded to the La India 2 land ( $23 ^\circ 00' 9''$  Lat N,  $102 ^\circ 30' 7''$  Long W). This isolate was labeled as IZ1 to indicate the location and home state, and number one as it was the first isolate obtained in the area. This isolate is part of the *Pochonia chlamydosporia* collection of the Phytopathology Program, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

On the PAA plates, the obtained isolate showed growth with cottony appearance, rounded edges and white color that eventually became creamy due to the chlamydospore production. The IZ1 isolate was morphologically identified as *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* according to Gams and Zare (2001) and Zare *et al.* (2001). The isolate usually showed prostrated conidiophores and poorly differentiated from the mycelium; seclusive phialides, or 2 to 3 per nodule in a whorl around each conidiophore. Conidiophores have hyaline or bright color unicellular conidia, and subglobose to ellipsoidal shape; they were attached and clustered in heads coated with an adhesive substance. Also, dictiochlamydospores or resistance structures were observed in the aerial mycelium.

**Evaluation of the parasitic potential. Root colonization tests.** SC1 and IZ1 isolates colonized 100% of the segments grown in PAA of all the plants tested. When Petri dishes were observed under the microscope, after

ello, se licuaron tres muestras de raíces (1 g cada una) (Ayoub, 1977) y se revisaron otras tres muestras de 1 g teñidas previamente con fucsina ácida (Byrd *et al.*, 1983), respectivamente. Del hongo se cuantificaron las UFC tanto en raíces como en suelo al final del experimento con el fin de corroborar su presencia y así asociar los efectos observados (Kerry, 1997; Perez *et al.*, 2007, 2011).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos de las variables medidas se sometieron a un análisis de varianza y cuando en éste se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Para tal fin se utilizó el programa Statistical Analysis System® para Windows V8.

## RESULTADOS

**Búsqueda de aislamientos nativos.** De las muestras de suelo y raíces colectadas en Zacatecas, así como de las masas de huevos de *N. aberrans* se obtuvo sólo un aislamiento a partir de suelo, mismo que correspondió a la localidad La India 2 (23 °00 '9 " lat N, 102 °30 '7 " long O), etiquetado como IZ1 para indicar la localidad y el estado de procedencia, así como el hecho de haber sido el primer aislamiento obtenido en la zona. Este aislamiento forma parte de la colección de *Pochonia chlamydosporia* del Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

En placas de PAA, el aislado presentó una colonia con apariencia algodonosa y bordes redondeados, de color blanco que con el tiempo se tornó color crema debido a la producción de clamidosporas. IZ1 se identificó morfológicamente como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* de acuerdo a las claves de Gams y Zare (2001), y Zare *et al.* (2001). El aislado presentó conidióforos por lo general postrados y poco diferenciados del micelio, fíalides solitarias, o de 2 a 3 por nódulo en verticilo. Los conidióforos portan conidios unicelulares hialinos o de color brillante, de forma subglobosa a elipsoidal; éstos mostraron estar adheridos y agrupados en cabezuelas recubiertas de una sustancia adhesiva. Además, se observaron dictioclamidosporas o estructuras de resistencia en el micelio aéreo.

**Evaluación del potencial parasítico. Pruebas de colonización de raíces.** El aislamiento SC1 e IZ1 colonizaron el 100 % de los segmentos sembrados en PAA de todas las plantas probadas. Al revisar las cajas Petri bajo el microscopio, y luego de siete días de haberse hecho la siembra de los fragmentos de raíz, se observó la presencia de clamidosporas sólo en aquellas que contenían fragmentos de raíces de calabaza; en el resto de los cultivos las clamidosporas se presentaron entre el noveno y el décimo día. Respecto a la colonización de raíces de variedades de frijol, tanto el aislamiento IZ1 como SC1 colonizaron también el 100 % de los segmentos sembrados; en este caso, la presencia de clamidosporas en los segmentos de raíces de todas las variedades de frijol probadas se dio al doceavo día de incubación.

**Parasitismo de huevos de *N. aberrans*.** Los dos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* parasitaron huevos de *N. aberrans*. En el caso del aislamiento SC1 el

seven days that the root fragments were placed, the presence of chlamydo spores was observed only on those containing fragments of squash roots; in other crops, chlamydo spores occurred between the ninth and tenth day. Regarding root colonization of different bean varieties, both IZ1 and SC1 isolates colonized also 100 % of segments placed on PPA plates; in this case, chlamydo spores presence in root segments of all bean varieties tested was observed at the twelfth day of incubation.

**Parasitism of *N. aberrans* eggs.** Both *Pochonia chlamydosporia* isolates parasitized *N. aberrans* eggs. In the case of SC1 isolate, parasitism percentage was 84 % while the IZ1 isolate parasitized 82 % of the nematode eggs.

**Effectiveness test on *N. aberrans* under greenhouse conditions.** Although there were no significant differences in the foliage dry weight of plants between different treatments, the IZ1 isolate at the highest chlamydo spores concentration in soil (IZ1-15000) showed the highest foliage dry weight compared to the rest of the plants (Table 2). Additionally, there were no significant differences in the fresh weight of roots; however, plants inoculated with SC1 isolate and those with high doses of IZ1, shown heavier weight on average (Table 2). In the galling index, highly significant differences between treatments ( $P = 0.001$ ) were detected; such index decreased in the roots of plants where IZ1 was applied at low (7500) and high (15000) chlamydo spores concentration into the soil. The reduction was 81.2 and 76.8 % compared with the absolute control plants and those that only received vermicompost, respectively (Table 2). The galling index reduction when SC1 isolate was applied was slightly lower (38 %) than when IZ1 isolate was applied (Table 2).

There were highly significant differences between treatments ( $P = 0.001$ ) in the number of  $J_3$  and  $J_4$  inside the roots; the most remarkable differences occurred in the roots where SC1 isolate was applied, since in these,  $J_3$  and  $J_4$  numbers was in average lower than in the other treatments. The number of  $J_3$ - $J_4$  juveniles inside on the roots of the plants where IZ1 was applied at low and high chlamydo spores concentration, was in average 30.5 and 43.8 % lower than the quantified on the plant roots where nematicide was applied; similarly, when comparing the number of juveniles of the treatments where isolate from Zacatecas was applied in the roots of the control plants, the reduction was 48 % (IZ1-15000) and 36 % (IZ1-7500). It is important to mention that applying only vermicompost to soil with *N. aberrans*, the number of individuals of both  $J_3$  and  $J_4$  was lower compared to the control, although not to the extent observed when *P. chlamydosporia* was added to the vermicompost (SC1 and IZ1 isolates in high doses).

Although there were no significant differences between treatments regarding the number of mature female  $g^{-1}$  root, the lowest number of females  $g^{-1}$  root was observed in the roots of plants treated with SC1 and IZ1. In these treatments, the reduction in the number of females ranged between 68.4 and 70 % compared to absolute control plants, and between 74 and 75.4 % compared to plants with nematicide applications (Table 2).

In plants with SC1 applications, it was possible to

porcentaje de parasitismo fue del 84 %, mientras que el aislamiento IZ1 parasitó un 82 % de los huevos del nematodo.

**Prueba de efectividad sobre *N. aberrans* en condiciones de invernadero.** Aunque no hubo diferencias significativas en el peso seco de follaje de las plantas entre los diferentes tratamientos, el aislamiento IZ1 a la concentración más alta de clamidosporas en suelo (IZ1-15000) presentó el mayor peso seco del follaje comparado con el resto de las plantas (Cuadro 2). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el peso fresco de raíces; sin embargo, las plantas inoculadas con el aislamiento SC1 y a las que se aplicó IZ1 a dosis alta presentaron mayor peso en promedio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los tratamientos aplicados en invernadero en plantas de frijol var. Flor de Mayo Criollo crecidas en suelo naturalmente infestado con *Nacobbus aberrans*.

Table 2. Effect of treatments applied in bean plants var. Flor de Mayo creole grown in soil naturally infested with *Nacobbus aberrans* under greenhouse conditions.

Tratamiento	PSF <sup>s</sup> (g)	PFR <sup>t</sup> (g)	IA <sup>u</sup>	J3 <sup>v</sup>	J4 <sup>w</sup>	HM <sup>x</sup>	UFCR <sup>y</sup>	UFCS <sup>z</sup>
TA	2.2 a <sup>f</sup>	3.1 a	6.9 a***	15 a***	10 a***	15 a	0 c***	0 c***
TA + V	2.1 a	3.3 a	5.6 ab	10 bc	8 ab	14 a	0 c	0 c
N	1.8 a	3.5 a	5.5 abc	13 ab	10 a	18 a	0 c	0 c
SCI	2.4 a	3.9 a	2.1 bc	7 c	5 b	5 a	17 b	12 a
IZI-7500	2.3 a	3.4 a	1.3 c	8 c	8 ab	4 a	16 b	5 b
IZI-15000	2.5 a	3.8 a	1.3 c	7 c	6 b	6 a	26 a	15 a
C.V.	18.18	14.86	49.34	19.83	23.09	64.86	37.01	32.68

\*\*\* Significativo por  $P < 0.001$

<sup>f</sup> Promedio de cuatro repeticiones. Números con la misma letra, dentro de la misma columna, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey por  $P < 0.05$

<sup>s</sup> Peso seco de follaje

<sup>t</sup> Peso fresco de raíces

<sup>u</sup> Índice de agallamiento (i.e., cociente del número de agallas entre el peso fresco de raíces)

<sup>v</sup> Juveniles del tercer estadio

<sup>w</sup> Juveniles del cuarto estadio

<sup>x</sup> Hembras maduras

<sup>y</sup> Unidades formadoras de colonias en raíces

<sup>z</sup> Unidades formadoras de colonias en suelo

C.V. Coeficiente de variación

En el Índice de agallamiento se detectaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $P < 0.001$ ); dicho índice se redujo en las raíces de plantas donde se aplicó IZ1 a baja (7500) y alta concentración (15000) de clamidosporas en el suelo. La reducción fue del 81.2 y 76.8 % comparado con las plantas del testigo absoluto y las que recibieron sólo vermicomposta, respectivamente (Cuadro 2). La reducción del índice de agallamiento al aplicar el aislamiento SC1 fue ligeramente menor (38 %) que al aplicar el aislamiento IZ1 (Cuadro 2).

Hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $P < 0.001$ ) en el número de J3 y J4 dentro de las raíces; las diferencias más notorias se presentaron en las raíces donde se aplicó el aislamiento SC1, ya que en éstas el número de J3 y J4 en raíces fue en promedio menor que en el

detect the presence of the fungus, a similar situation to that observed in plants where IZ1 was applied at both concentrations. *Pochonia chlamydosporia* grew up only in the plates where processed roots of inoculated plants were present. The highest UFC number in roots corresponded to the IZ1-15000 treatment (Table 2). As for the UFC number in soil, the fungus was only detected in the treatments where this was inoculated. The highest UFC number in soil corresponded to the SC1 and IZ1 treatments at high concentration (15,000 chlamydo spores  $g^{-1}$  soil) (Table 2).

## DISCUSSION

Isolation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtained from soil samplings, galled roots

and associated egg masses represent the first record of the presence of such nematophagous fungus in soils of Zacatecas state, adding to those reported in other regions of the country (Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009).

*Pochonia chlamydosporia* as a potential agent for biological control of pathogenic nematodes of agricultural importance, must meet a number of requirements that allow to select and discriminate among ineffective isolates to those that potentially can be exploited on a large scale and commercially. According to Kerry (1997), *P. chlamydosporia* isolates with potential for use as biological control agents should record rates of 80 % or more in both laboratory tests (eggs parasitism and roots colonization) so that they can be then evaluated under greenhouse and field conditions.

resto de los tratamientos. El número de juveniles J3-J4 en las raíces de las plantas donde se aplicó IZ1 a baja y alta concentración de clamidosporas fue en promedio 30.5 y 43.8 % menor que el cuantificado en las raíces de las plantas donde se aplicó el nematicida; de igual manera, al comparar el número de juveniles de los tratamientos en los cuales se aplicó el aislamiento zacatecano con el observado en las raíces de las plantas del testigo absoluto, la reducción en promedio fue del 48 % (IZ1-15000) y del 36 % (IZ1-7500). Cabe mencionar que al aplicar sólo vermicomposta al suelo con *N. aberrans*, el número de individuos tanto de J3 como de J4 fue menor en comparación con el testigo, aunque no en la magnitud que se observó cuando a la vermicomposta se le adicionó *P. chlamydosporia* (aislamientos SC1 e IZ1 en dosis alta).

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos con relación al número de hembras maduras  $g^{-1}$  de raíz, en las raíces de las plantas tratadas con SC1 e IZ1 se presentó el menor número de hembras  $g^{-1}$  de raíz. En estos tratamientos, la reducción en el número de hembras osciló entre 68.4 y 70 % respecto a las plantas del testigo absoluto, y entre el 74 y 75.4 % comparado con las plantas a las que se les aplicó nematicida (Cuadro 2).

En las plantas a las que se les aplicó SC1, fue posible detectar la presencia del hongo, situación similar a la observada en las plantas donde se aplicó IZ1 a ambas concentraciones. *Pochonia chlamydosporia* se observó creciendo sólo en las cajas donde se procesaron raíces de plantas inoculadas. El mayor número de UFC en raíces correspondió al tratamiento IZ1-15000 (Cuadro 2). En cuanto al número de UFC en suelo, el hongo sólo se detectó en los tratamientos donde éste se inoculó. El mayor número de UFC en suelo correspondió a los tratamientos con SC1 e IZ1 a alta concentración (15,000 clamidosporas  $g^{-1}$  de suelo) (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

El aislamiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* obtenido a partir de los muestreos de suelo, raíces agalladas y masas de huevos asociadas representa el primer registro de la presencia de dicho hongo nematófago en suelos del estado de Zacatecas, sumándose así a los reportados en otras regiones del país (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009).

*Pochonia chlamydosporia*, como un agente potencial de control biológico de nematodos fitopatógenos de importancia agrícola, debe cumplir con una serie de requisitos los cuales permiten seleccionar y discriminar entre aislamientos poco efectivos y aquellos que potencialmente pueden explotarse a gran escala y de manera comercial. De acuerdo con Kerry (1997), los aislamientos de *P. chlamydosporia* con potencial para utilizarse como agentes de control biológico deben registrar porcentajes de 80 % o más en ambas pruebas de laboratorio (parasitismo de huevos y colonización de raíces), para posteriormente proceder a su evaluación en invernadero y campo.

Como se ha establecido con anterioridad, *P. chlamydosporia*, una vez presente en suelo, no sólo se alimenta de huevos de nematodos sino que es capaz de

As stated previously, once *P. chlamydosporia* is present in soil it does not only feeds on nematode eggs but also it is able to feed on organic matter and colonize the rhizosphere of several cultivated plants; in fact, this colonization phenomenon has been studied in detail and evidence that the fungus is able to colonize the roots even endophytically has been found (Bordallo *et al.*, 2002; Macia *et al.*, 2009b).

This fungus does parasite the active stages of nematodes, mainly eggs and sometimes sessile females (Hidalgo *et al.*, 2000, Kerry, 1997); for this reason, root colonization is a key event to enhance contact with eggs contained in the gelatinous masses found on the roots surface (Kerry & Bourne, 1996). This is the main reason why root colonization is essential in the selection and evaluation of isolates of this fungus for the control of *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991, Hidalgo *et al.*, 2000; Sorrentino *et al.*, 2003) and false root-knot nematode (Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009, Perez *et al.*, 2007). Moreover, roots colonization is even more important because of the evidences that this interaction can be endophytic (Bordallo *et al.*, 2002). Such interaction, according to Maciá *et al.* (2009a and b), may be beneficial for colonized plants, as they not only promote their growth, but also protect them from attack by fungal pathogens.

To know the colonization capacity in plants with different susceptibility degree to the nematode, also allows to use to *P. chlamydosporia* in combination with rotation schemes to induce their development and maintain their presence in soil after application, without numerous and consistent applications; this practice has been successful in the management of root-knot nematodes under specific management (Atkins *et al.*, 2003b; Kerry and Hidalgo, 2004).

In the present study, the results of the colonization tests allowed to advance in the knowledge about the potential of this new isolate from Zacatecas state, besides that it is the first time that tests are done in plants that can be used in rotation schemes and even in host varieties of interest (bean in this case) with different susceptibility degree to the nematode. This makes a difference with respect to previous studies in which tests were directed only towards plants highly susceptible to *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008, Perez *et al.*, 2007). The knowledge gained will allow knowing which of the tested plants (that can be used as part of rotation cycles in Zacatecas state) can stimulate the presence and maintenance of the fungus in the rhizosphere and in the soil itself, under a nematode biomanagement scheme in which crop rotation or planting resistant varieties are incorporated. In this scheme it is also important the role of the organic matter that is incorporated as a vehicle of the fungus application. In the present study, vermicompost was the source of organic matter, whose properties have been documented as a source of slow release nutrients, promoter in the production of phenolic compounds (increasing resistance to herbivory), enhancer of soil microbial diversity and as a biopesticide (Dominguez *et al.*, 2010). Although in this study there was no apparent effect of one single vermicompost application as documented by Villa *et al.*

alimentarse de materia orgánica y colonizar la rizosfera de varias plantas cultivadas; de hecho, este fenómeno de colonización se ha estudiado con detalle y se ha encontrado evidencia respecto a que el hongo es capaz de colonizar las raíces incluso endofíticamente (Bordallo *et al.*, 2002; Maciá *et al.*, 2009 a y b).

Este hongo parasita las etapas activas de los nematodos, principalmente huevos y en contadas ocasiones hembras sésiles (Hidalgo *et al.*, 2000; Kerry, 1997); por tal motivo, la colonización de raíces es un evento fundamental para potenciar el contacto con los huevos contenidos en las masas gelatinosas que se encuentran sobre la superficie de las raíces (Kerry y Bourne, 1996). Esta es la principal razón del por qué la colonización de raíces es básica en el proceso de selección y evaluación de aislamientos de este hongo para el control de *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000; Sorribas *et al.*, 2003) y del nematodo falso nodulador (Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007). Además, la colonización de las raíces cobra aún mayor importancia al encontrarse evidencias de que dicha interacción puede ser endofítica (Bordallo *et al.*, 2002). Esta interacción, de acuerdo con Maciá *et al.* (2009a y b), puede ser benéfica para las plantas colonizadas, ya que no sólo promueve su crecimiento, sino que además las protege contra el ataque de hongos fitopatógenos.

Conocer la capacidad de colonización en plantas con diferente grado de susceptibilidad al nematodo, también permite utilizar a *P. chlamydosporia* en conjunto con esquemas de rotación para así inducir su desarrollo y mantener su presencia en suelo una vez aplicado, ello sin necesidad de recurrir a numerosas y constantes aplicaciones del mismo, experiencia que ha resultado exitosa en el manejo de nematodos agalladores bajo condiciones específicas de manejo (Atkins *et al.*, 2003b; Kerry y Hidalgo, 2004).

En el presente estudio, los resultados de las pruebas de colonización permitieron avanzar en el conocimiento sobre el potencial del nuevo aislamiento proveniente del estado de Zacatecas, además de que por primera vez se probaron plantas que pueden ser utilizadas en esquemas de rotación e incluso variedades del hospedante de interés (en este caso frijol) con diferente grado de susceptibilidad al nematodo. Esto marca una diferencia con relación a estudios previos en los cuales las pruebas se dirigieron sólo hacia plantas altamente susceptibles a *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007). El conocimiento obtenido permitirá saber con cuáles de las plantas probadas, y que pueden ser empleadas como parte de ciclos de rotación en el estado de Zacatecas, se puede estimular la presencia y mantenimiento del hongo en la rizosfera y en el suelo mismo, bajo un esquema de biomanejo del nematodo en el cual se incorpore la rotación de cultivos o la siembra de variedades resistentes. En este esquema también es importante el papel que juega la misma materia orgánica que se incorpora como vehículo de aplicación del hongo. En el presente estudio la fuente de materia orgánica fue la vermicomposta, de la cual se han documentado sus propiedades como: fuente de nutrientes de liberación lenta, promotora en la producción de compuestos fenólicos

(2008) against the same *N. aberrans* and by Castro *et al.* (2011) against *M. incognita*, the results observed in the number of nematodes in the roots (J3, J4 and mature females) were smaller in percentage compared to the nematicide application and absolute control; the reductions were clear and sometimes significant when vermicompost was used as a vehicle for the fungus application.

While it is true that the root colonization ability is a good reference to assess the potential of a *P. chlamydosporia* isolate, when the analysis of the ability to infect nematode eggs is added, it is possible to discriminate and select the most effective isolates. In previous studies (Flores *et al.*, 2007, Flores *et al.*, 2008, Franco *et al.*, 2009, Hidalgo *et al.*, 2000, Perez *et al.*, 2007) it was observed that isolates with the highest parasitism percentages, regardless of colonizing capacity, showed the best results in reducing galling on tomato roots by *N. aberrans* under greenhouse conditions. In this study, the parasitism test with SC1 and IZ1 gave a percentage above 80% for both, therefore, they are considered potential agents for biological control of false root-knot nematode; these percentages were higher than those shown by other isolates of *P. chlamydosporia* with *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991, Hidalgo *et al.*, 2000) and very similar to parasitism exerted on *N. aberrans* eggs (Flores *et al.*, 2008, Perez *et al.* 2007, Perez *et al.*, 2011). In the case of SC1 isolate, parasitism observed is relevant because this isolate has already been tested with nematode populations from Puebla (Perez *et al.*, 2007) and Mexico State (Perez *et al.*, 2011), but not with a population from Zacatecas associated to beans. Therefore, such isolate could also be tested at some point in the pathosystem *N. aberrans*-beans.

Also, although not significant, bean plants showed higher biomass with SC1 and IZ1 treatments. More experiments are required in the future to re-evaluate this effect. Zacatecas isolate remained present throughout the experiment, and it could be re-isolated from soil and roots of all treatments where applied; this coincides with the results obtained in previous studies under greenhouse conditions with both *Meloidogyne* (De Leij and Kerry, 1991; Verdejo *et al.*, 2003) and *N. aberrans* (Perez *et al.*, 2007, Perez *et al.*, 2011).

In previous studies carried out for *N. aberrans* control in tomato (Perez *et al.*, 2007) and chili (Perez *et al.*, 2011), also promising results were obtained for *P. chlamydosporia* used as a reference (SC1) as a biological control agent. In both studies, the application of high doses (15,000 chlamydospores g<sup>-1</sup> soil) of *P. c.* var. *chlamydosporia* in chili and tomato plants grown in the greenhouse, significantly reduced both the number of juveniles and mature females, as well as its harmful effect on plants. Although with different pathosystem, De Leij *et al.* (1993) reported 50 % reduction of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* in tomato roots by applying *P. chlamydosporia*; and on the other hand, Mousa *et al.* (1995) reduced up to 80 % the number of females of *Meloidogyne javanica* and 50 % the number of galls on tomato by applying this fungus two weeks before transplanting. Vianene and Abawi (2000) have also documented adverse *P.*

(incremento de la resistencia a la herbivoría), potenciadora de la diversidad microbiana del suelo y bioplaguicida (Domínguez *et al.*, 2010). Aunque en el presente trabajo no se observó un efecto evidente de la sola aplicación de vermicomposta como ha sido documentado por Villa *et al.* (2008) contra el mismo *N. aberrans* y por Castro *et al.* (2011) contra *M. incognita*, los resultados observados en cuanto al número de nematodos dentro de las raíces (J3, J4 y hembras maduras) fueron porcentualmente menores en comparación con la aplicación del nematocida y el testigo absoluto; las reducciones fueron claras y en algunos casos significativas, cuando la vermicomposta se utilizó como el vehículo de aplicación del hongo.

Si bien es cierto que la capacidad de colonización de raíces es un buen referente para valorar el potencial de un aislamiento de *P. chlamydosporia*, cuando a ésta se le suma el análisis de la capacidad para parasitar huevos de nematodos, es posible discriminar y seleccionar los aislamientos más eficaces. En estudios previos (Flores *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2007) se observó que aquellos aislamientos con los más altos porcentajes de parasitismo, independientemente de su capacidad colonizadora, mostraron los mejores resultados en invernadero al reducir el agallamiento en raíces de jitomate por *N. aberrans*. En el presente estudio la prueba de parasitismo con SC1 e IZ1 arrojó un porcentaje arriba del 80 % para ambos, con lo cual se consideran agentes potenciales para el control biológico del nematodo falso nodulador; tales porcentajes fueron mayores a los mostrados por otros aislamientos de *P. chlamydosporia* con *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Hidalgo *et al.*, 2000) y muy similares al parasitismo ejercido sobre huevos de *N. aberrans* (Flores *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011). En el caso del aislamiento SC1, el parasitismo observado es relevante por el hecho de que este aislamiento ya ha sido probado con poblaciones del nematodo provenientes de Puebla (Pérez *et al.*, 2007) y del Estado de México (Pérez *et al.*, 2011), pero no con una población de Zacatecas asociada a frijol. De esto se desprende que dicho aislamiento también pudiera ser probado en algún momento en el patosistema *N. aberrans*-frijol.

También, aunque no significativo, en los tratamientos con IZ1 y SC1 las plantas de frijol presentaron mayor biomasa. Se requiere repetir estos experimentos en el futuro para reevaluar este efecto. El aislamiento de Zacatecas se mantuvo presente a lo largo del experimento, y pudo ser re-aislado del suelo y raíces de todos los tratamientos donde se aplicó; esto coincide con lo obtenido en estudios previos bajo condiciones de invernadero tanto con *Meloidogyne* (De Leij y Kerry, 1991; Verdejo *et al.*, 2003) como con *N. aberrans* (Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011).

En trabajos realizados para el control de *N. aberrans* en jitomate (Pérez *et al.*, 2007) y chile (Pérez *et al.*, 2011), también se obtuvieron resultados promisorios en cuanto al uso, como agente de control biológico, del aislamiento de *P. chlamydosporia* utilizado como referencia (SC1). En ambos estudios, la aplicación de *P. c.* var. *chlamydosporia* a dosis alta (15,000 clamidosporas g<sup>-1</sup> de suelo) en plantas de

*chlamydosporia* effects on eggs and even second-stage juveniles of *M. hapla* in lettuce. Recently Ebadi *et al.* (2009) found *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolate is able to infect 40 % of the eggs and reduce up to 56 % the *M. incognita* population in pistachio.

Despite the results obtained in this study and the potential shown by the *P. chlamydosporia* isolate from Zacatecas state, it is necessary to continue the study by implementing and standardize its production on a larger scale with the aim to test its parasitic potential under field conditions, and determine their effectiveness in a wider range of conditions before its extensive use as a biocontrol agent in the pathosystem *N. aberrans*-beans.

## CONCLUSIONS

This study contributes to widen the knowledge about *P. chlamydosporia* in Mexico, first because this is the first report of an isolate obtained in Zacatecas and secondly, because it confirms the importance of this fungus as an alternative in the false root-knot nematode control in several crops, beans among them.

**Acknowledgements.** The present work, with the consequent graduation of one of the authors, was conducted thanks to CONACYT funding through its Programa de Becas de Posgrado Nacionales. Special thanks to Dr. Jorge A. Acosta Gallegos, researcher at INIFAP-Campus Experimental Valle de México, for providing bean varieties used in root colonization tests.

## LITERATURA CITADA

- Atkins SD, Hidalgo DL, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR. 2003a. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. *Mycological Research* 107:206-212.
- Atkins SD, Hidalgo DL, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR and Kerry BR. 2003b. Development for a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Management Science* 59:183-189.
- Ayoub SM. 1977. *Plant Nematology*. An Agricultural Training Aid. Department of food and agriculture. Division of plant industry. Laboratory Services-Nematology. USA. 157p.
- Bordallo JJ, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Persmark L and Asensio L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist* 154:491-499.
- Bourne JM, Kerry BR and De Leij FAAM. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. Supplement of *Journal of Nematology* 26:587-591.
- Bourne JM, Kerry BR and De Leij FAAM. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology* 6:539-548.
- Byrd DW Jr, Kirkpatrick T and Barker KR. 1983. An



chile y jitomate en invernadero, redujo sensiblemente tanto el número de juveniles y hembras maduras, como su efecto dañino sobre las plantas. Aunque con otro patosistema, De Leij *et al.* (1993) registraron la reducción del 50 % de juveniles infectivos de *Meloidogyne incognita* en raíces de jitomate al aplicar *P. chlamydosporia*; por su parte Mousa *et al.* (1995) lograron reducir hasta un 80 % el número de hembras de *Meloidogyne javanica* y 50 % el número de agallas en jitomate al aplicar este hongo dos semanas antes del trasplante. Vianene y Abawi (2000) también han documentado efectos negativos de *P. chlamydosporia* sobre huevos e incluso juveniles del segundo estadio de *M. hapla* en lechuga. Recientemente Ebadi *et al.* (2009), encontraron un aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* capaz de parasitar el 40 % de los huevos y reducir hasta en un 56 % la población de *M. incognita* en pistache.

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio y del potencial mostrado por el aislamiento de *P. chlamydosporia* proveniente del estado de Zacatecas, es necesario dar continuidad al trabajo e implementar y estandarizar su producción a mayor escala con el fin de probar su potencial parasítico en condiciones de campo, y así determinar su efectividad en un rango más amplio de condiciones antes de utilizarlo de manera más extensiva como agente de control biológico en el patosistema *N. aberrans*-frijol.

## CONCLUSIONES

El presente estudio contribuye al conocimiento sobre *P. chlamydosporia* en México, primeramente por el hecho de ser el primer reporte de un aislamiento obtenido en Zacatecas y segundo, al confirmar la importancia de este hongo como una alternativa más en el control del nematodo falso nodulador en varios cultivos, entre ellos el frijol.

**Agradecimientos.** El presente trabajo, con la consecuente titulación de uno de los autores, se llevó a cabo gracias al financiamiento del CONACYT a través de su Programa de Becas de Posgrado Nacionales. Un especial agradecimiento al Dr. Jorge A. Acosta Gallegos, Investigador del INIFAP-Campus Experimental Valle de México, por haber proporcionado las variedades de frijol utilizadas en las pruebas de colonización de raíces.

---

improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.

- Castro L, Flores L y Uribe L. 2011. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agronomía Costarricense* 35:21-32.
- Cristóbal AJ, Cid Del Prado VI, Sánchez GP, Marbán MN, Manzanilla LRH y Mora AG. 2001a. Alteraciones nutrimentales en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por efecto de *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 31:221-228.
- Cristóbal AJ, Cid del Prado VI, Marbán MN, Sánchez GP, Mora AG y Manzanilla LRH. 2001b. Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en

condiciones de campo. *Nematopica* 31:229-235.

- De Leij FAAM and Kerry BR. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potencial biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. *Revue of Nematologie* 14:157-164.
- De Leij FAAM, Kerry BR and Dennehy JA. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 38:112-122.
- De Leij FAAM, Kerry BR and Dennehy JA. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot test. *Nematologica* 39:115-126.
- Domínguez J, Gómez BM y Lazcano C. 2010. Propiedades bioplaguicidas del vermicompost. *Acta Zoologica Mexicana* (n. s.) Número Especial 2: 373-383.
- Ebadi M, Fatemy S and Riahi H. 2009. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. *Biocontrol Science and Technology* 19: 689-700.
- Flores CR, Manzanilla LRH, Cid del Prado VI y Martínez GA. 2007. Control of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 with *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*) (Goddard) Zare and W. Gams. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:26-34.
- Flores CR, Atkins SD, Manzanilla LRH, Cid Del Prado VI y Martínez GA. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams & Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:93-104.
- Franco NF, Vilchis MK and Miranda DJ. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 39:133-142.
- Gams W and Zare R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72:329-337.
- Hernández AJ. 2001. Respuesta de Genotipos de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Nacobbus aberrans*. Tesis Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Montecillo, Edo. de México. p 75.
- Hidalgo DL, Bourne JM, Kerry BR and Rodriguez MG. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46:277-284.
- Hirsch PR, Atkins SD, Mauchline TH, Morton CO, Davies KG and Kerry BR. 2001. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. *Plant and Soil* 232:21-30.
- Kerry BR, Simon A and Rovira AD. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *H. avenae*. *Annals of Applied Biology* 105:509-516.
- Kerry BR and Bourne JM. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant

- parasitic nematodes a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Science* 47:69-75.
- Kerry BR. 1997. A Workshop Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium* As a Biological Control Agent for Root-knot Nematodes. Integrated Approach to Crop Research. Rothamsted Long Ashton Broom's Barn, UK. 90 p.
- Kerry BR and Hidalgo DL. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. *Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control*. IOBC-WPRS Bulletin 27:123-126.
- Lopez LLV, Bordallo JJ, Salinas J, Monfort E, López SML. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron* 33:61-67.
- Maciá VJG, Jansson HB, Talbot NJ and Lopez LLV. 2009a. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist* 182:213-228.
- Maciá VJG, Rosso LC, Ciancio A., Jansson HB and Lopez LLV. 2009b. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia* effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology* 155:391-401.
- Manzanilla LRH, Costilla MA, Doucet M, Franco J, Inserra RN, Lehman PS, Cid Del Prado VI, Souza RM and Evans K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Monfort E, Lopez LLV, Jansson HB, Salinas J, Park JO and Sivasithamparam K. 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology & Biochemistry* 37:1229-1235.
- Mousa ME, Basiony MA and Mahdy EM. 1995. Control of *Meloidogyne javanica* by *Verticillium chlamydosporium* on tomatoes. *Afro-Asian Journal of Nematology* 5:113-115.
- Pérez RI, Doroteo MA, Franco NF, Santiago SV and Montero PA. 2007. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potencial biological control agents of *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 37:127-134.
- Pérez RI, Franco NF, Cid Del Prado VI y Zavaleta ME. 2011. Control de *Nacobbus aberrans* en chile ancho (*Capsicum annum* L.) mediante el uso combinado de enmiendas orgánicas, hongos nematófagos y nematicidas. *Nematropica* 41:122-129.
- Sorribas FJ, Ornat C, Galeano M and Verdejo LS. 2003. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology* 13:707-714.
- Verdejo LS, Sorribas FJ, Ornat C and Galeano M. 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* 52:521-528.
- Vianene NM and Abawi GS. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology* 32:85-100.
- Villa BA, Zavaleta ME, Vargas HM, Gómez RO y Ramírez AS. 2008. Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:249-255.
- Wang K, Riggs RD and Crippen D. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology* 95:890-893.
- Zare R, Gams W and Evans HC. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73:51-86.

## *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. y 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 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) 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 (GGARGTACCAGTG/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 fíalides 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

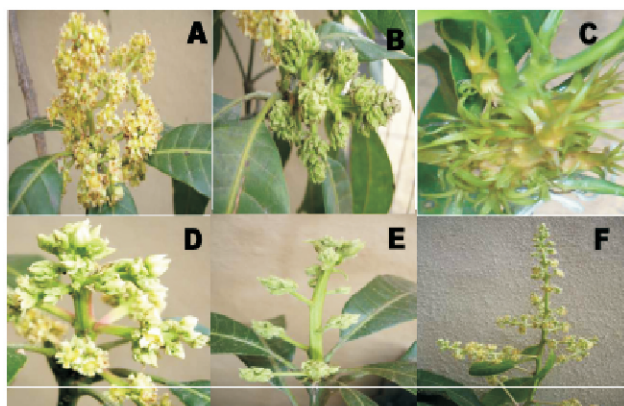


Figura 1. Síntomas inducidos en plantas de mango por aislados de *Fusarium* obtenidos de árboles de mango malformados en Jalisco. **A, B.** Malformación floral, MXJAL-2; **C.** Malformación vegetativa; **D.** Malformación floral, MXJA-8; **E.** Malformación floral, MXJAL-11; **F.** Planta control.

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*

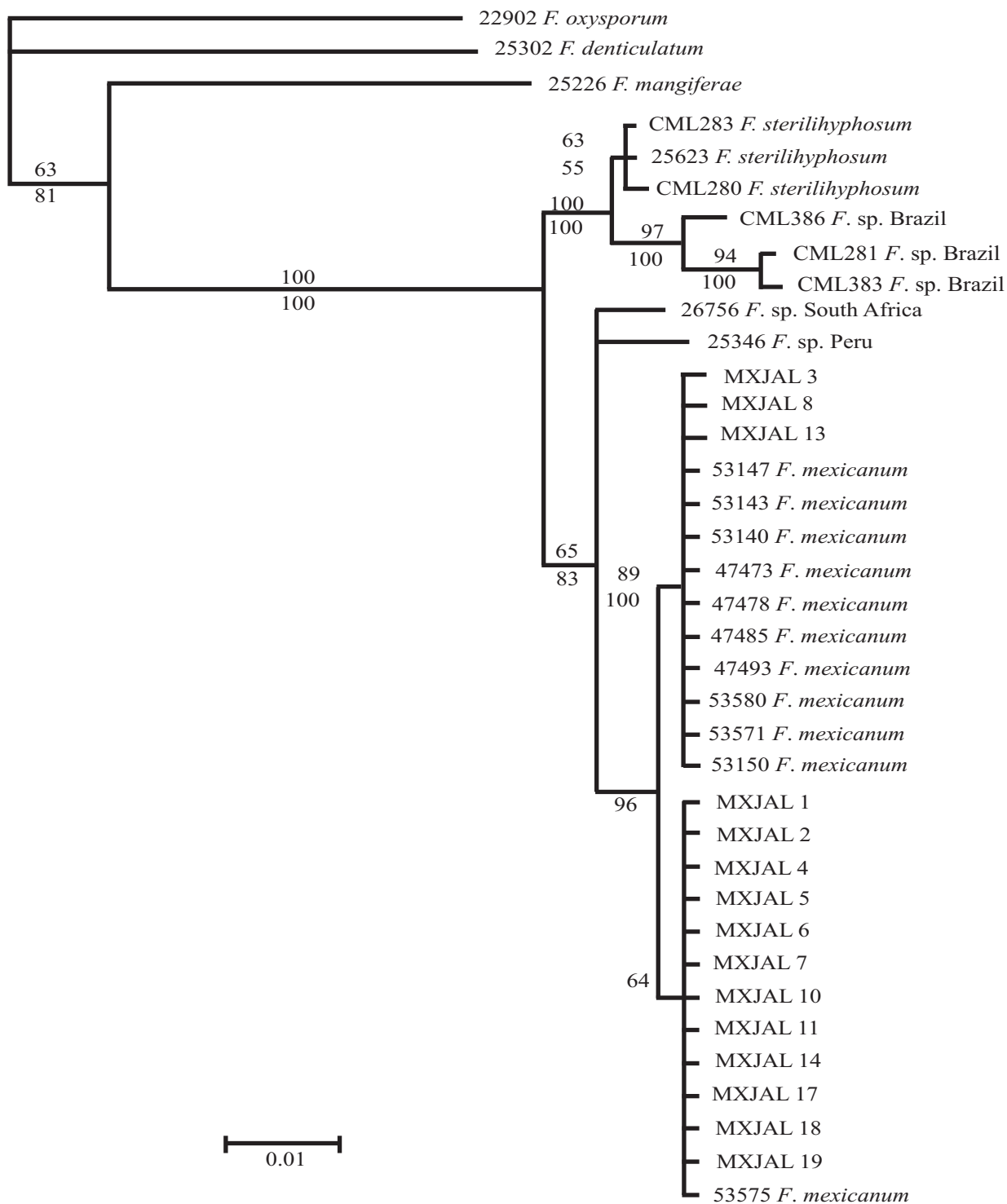


Figura 2. Árbol de consenso estricto a partir de 46 árboles más parsimoniosos (índice de consistencia de 90 e índice de retención de 95) obtenidos del análisis de la matriz combinada de secuencias de EF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Agrupamientos con apoyo estadístico se indican sobre el brazo el 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.

## 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 250 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 50 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . El medio mínimo (MM) (Correll *et al.*, 1987) fue hecho agregando 2 g  $\text{NaNO}_3$  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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 250 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 50 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . Minimal medium (MM) (Correll *et al.*, 1987) was made by adding 2 g  $\text{NaNO}_3$  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  $\text{NaNO}_3$ , 1.6 g L-asparagine and 15 g  $\text{KClO}_3$ , to 1 L of basal medium. Two concentrations of  $\text{KClO}_3$  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 ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_6$ ), 2 g/L nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), 0.5 g/L nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) 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  $\mu\text{l}$  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

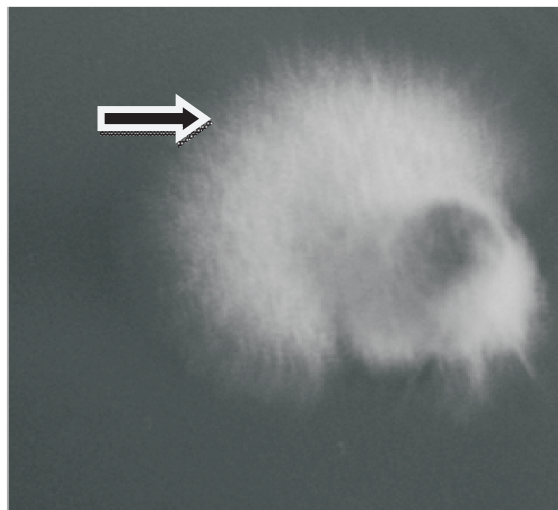


Figura 1. Un sector de micelio (flecha) de *Fusarium mexicanum* creciendo en medio mínimo suplementado con  $\text{KClO}_3$  1.5 %, produciendo un mutante (*nit*) resistente al clorato, que no utiliza  $\text{NO}_3^-$ .

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

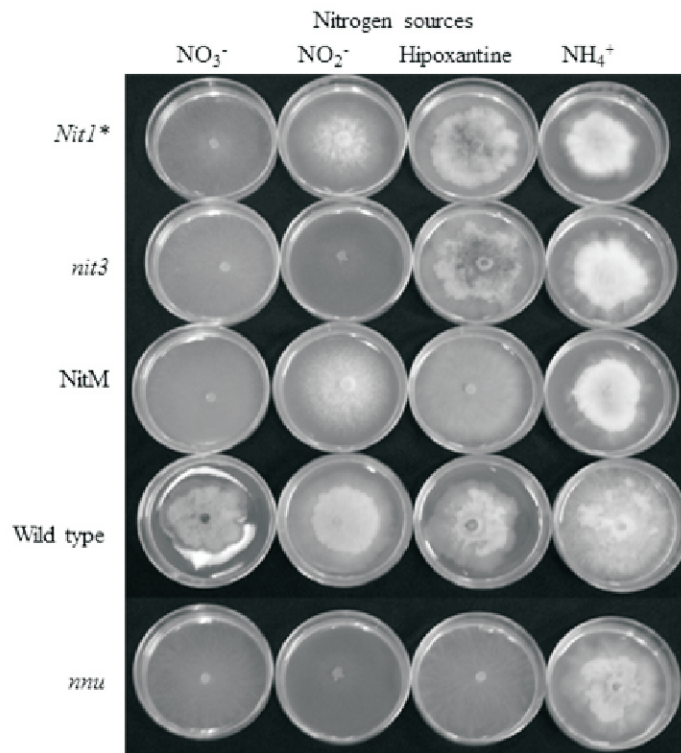


Figura 2. Clasificación fenotípica de mutantes (*nit*) de *Fusarium mexicanum* que no utilizan nitrato, por su crecimiento en medio mínimo suplementado con varias fuentes de nitrógeno. \* Tipos de mutantes.

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* mutants 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, heterocárico, 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



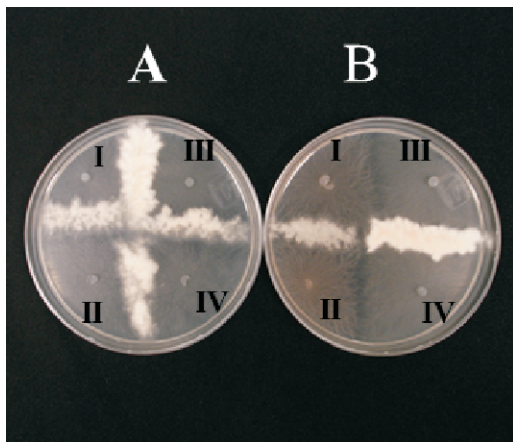


Figura 3. Heterocariones protótrofos formados en medio mínimo suplementado con  $\text{NaNO}_3$  por mutantes *nit* generados de aislados de *Fusarium mexicanum*. A) Pruebas de complementación vegetativa entre mutantes de aislados en el mismo GCV. AI, AII) mutantes NitM y *nit1* respectivamente de MXJAL-8. 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. sterilihyphosum*

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 *Hypoxylon 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.

## Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México

### Fungi Associated to Blueberry Foliage in Los Reyes, Michoacan, Mexico

Alejandra Mondragón Flores, José López Medina, Salvador Ochoa Ascencio y Maribel Gutiérrez Contreras, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas esquina con Berlín, Colonia Viveros, Uruapan, Michoacán, CP 60090, México. Correspondencia: mondragon\_flores@hotmail.com

(Recibido: Agosto 08, 2011 Aceptado: Mayo 09, 2012)

Mondragón Flores, A., López Medina, J., Ochoa Ascencio, S. y Gutiérrez Contreras, M. 2012. Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:141-144.

**Resumen.** El objetivo del estudio consistió en identificar morfológicamente los hongos asociados a sintomatologías presentes en hojas, tallos y frutos del arándano y determinar su incidencia estacional en la principal zona productora de esta frutilla en Michoacán, México. Entre marzo 2009 y febrero 2010 se tomaron al azar, en el 5 % de plantas de tres huertos comerciales, se colectaron muestras de hojas, tallos y frutos con síntomas atribuidos a hongos. A partir de tejido dañado se hicieron aislamientos en PDA y se obtuvieron cepas puras de hongos. Para la identificación de los hongos a nivel de género se emplearon claves especializadas. Se identificaron 12 hongos asociados a 12 sintomatologías, entre éstas: pudrición del fruto (*Alternaria*, *Colletotrichum*), manchas foliares (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*), roya (*Pucciniastrum*), atizomamiento y cáncer del tallo (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*) y tizón de yemas (*Chaetomium*, *Phoma*). La roya presentó la mayor incidencia (84.39 %), principalmente durante primavera. Los hongos aislados con mayor frecuencia fueron *Colletotrichum* y *Alternaria*.

Palabras clave adicionales: *Vaccinium* sp., diagnóstico, incidencia.

El arándano (*Vaccinium* spp.) en la última década ha adquirido una gran importancia por su alto valor nutritivo y demanda a nivel mundial. En México esta frutilla es de reciente introducción, teniendo registradas 200 ha en Michoacán. Diversos hongos han sido reportados induciendo daños en arándano en todos los órganos de la planta en diferentes zonas productoras del mundo, entre los que destacan: *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Microsphaera vaccinii*, *Phomopsis vaccinii*, *Stemphyllium* sp. (Cline y Schilder, 2006), *Bipolaris cynodontis* (Sisterna et al., 2009), *Botrytis cinerea* (Bristow y Milholland, 1995), *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* (Milholland, 1995a ; Wharton y Schilder, 2008), *Dothichiza caroliniana*

**Abstract.** The aim of the study was to identify morphologically the fungi associated to symptomatology present in leaves, stems and blueberry fruits and determine its seasonal incidence in the main producing area of this berry in Michoacán, Mexico. Between March 2009 and February 2010, some leaves, stems and fruits with symptoms attributed to fungi were randomly collected from 5% of the plants of three commercial orchards. Isolates in PDA were made from damaged tissue and the pure fungal strains were obtained. Specialized keys were used for fungi identification at genus level. Twelve fungi were identified associated to 12 symptomatology, among them: fruit rot (*Alternaria*, *Colletotrichum*), leaf spot (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*), rust (*Pucciniastrum*), blighting and stem canker (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*) and bud blight (*Chaetomium*, *Phoma*). The rust showed the highest incidence (84.39%), mainly during spring. The most frequently isolated fungi were *Colletotrichum* and *Alternaria*.

**Additional Keywords:** *Vaccinium* sp., diagnosis, incidence.

In the last decade, blueberries (*Vaccinium* spp.) have become very important because of their high nutritional value and worldwide demand. In Mexico this fruit has been recently introduced with reports of 200 ha in Michoacan. Several fungi have been reported to induce damage in blueberry and all plant organs in different producing areas of the world, among them: *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Microsphaera vaccinii*, *Phomopsis vaccinii*, *Stemphyllium* sp. (Cline and Schilder, 2006), *Bipolaris cynodontis* (Sisterna et al., 2009), *Botrytis cinerea* (Bristow and Milholland, 1995), *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* (Milholland, 1995a; Wharton and Schilder, 2008), *Dothichiza caroliniana* (Milholland, 1995b), *Phyllosticta vaccinii* (Szmagara, 2009), *Gloeocercospora inconspicua* (Milholland, 1995c), *Exobasidium vaccinii* (Nickerson, 1995), *Pucciniastrum vaccinii* (Dal Bello and Perello 1998), *Phoma* sp. (Szmagara 2009), *Cercospora* sp. (Milholland, 1995e), *Godronia cassandrae* (Ramsdell, 1995), *Gloeosporium minus* (Milholland, 1974), *Septoria*

(Milholland, 1995b), *Phyllosticta vaccinii* (Szmagara, 2009), *Gloeocercospora inconspicua* (Milholland, 1995c), *Exobasidium vaccinii* (Nickerson, 1995), *Pucciniastrum vaccinii*, (Dal Bello y Perelló 1998) *Phoma* sp. (Szmagara 2009), *Cercospora* sp. (Milholland, 1995e), *Godronia cassandrae* (Ramsdell, 1995), *Gloeosporium minus* (Milholland, 1974), *Septoria albopunctata* (Milholland, 1995d), *Botryosphaeria* sp., *Pestalotiopsis* sp., (Espinoza *et al.*, 2009). En Michoacán, México, es importante conocer las enfermedades en huertos comerciales de arándano, para establecer estrategias de control y manejo que contribuyan al mejoramiento de su productividad. El objetivo de esta investigación fue identificar morfológicamente, a nivel de género, los hongos asociados a hojas, tallos y frutos del arándano y determinar la incidencia estacional de las mismas en Los Reyes Michoacán. Esto solo como una medida preventiva y exploratoria para iniciar con el estudio formal de las enfermedades más importantes del arándano.

Las colectas de material enfermo se hicieron de 2009 a 2010 en las estaciones de primavera, otoño e invierno, suspendiéndose en el verano por ser la época de poda. Se determinó la incidencia estacional de cada uno de los síntomas identificados en tres sitios de colecta (huertos: El Barreno, La Alameda y La Loma) con un tamaño de muestra del 5 % de las plantas de la población (7 ha). En laboratorio, las muestras colectadas se procesaron mediante las técnicas comunes (Agrios, 2005) de aislamiento de hongos en PDA (Bioxon®) e incubadas a temperatura ambiente. La identificación de los hongos obtenidos se llevó a cabo con base en características de forma, color y apariencia de las colonias miceliales, y forma de estructuras reproductivas; ello mediante el uso de literatura especializada (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2006; Hanlin, 2001; Maharachchikumbura *et al.*, 2011; Wikee *et al.*, 2011).

De las muestras colectadas se identificaron a 12 hongos asociados a la parte aérea del arándano. En los frutos se observaron dos tipos de síntomas: “pudrición seca” (*Alternaria* sp.) y “pudrición suave” (*Colletotrichum* sp.). En hojas se observaron cinco tipos de síndromes: “mancha plateada” (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp. y *Stemphyllium* sp.), “mancha cobriza” (*Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp.), “tizón foliar” (*Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.), “mancha marrón”, (*Colletotrichum* sp.) y roya (*Pucciniastrum* sp.). En los tallos se detectaron tres enfermedades: entre ellas “tizón de tallo”, (*Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.), “costra del tallo” (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.) y “cancro” (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp.). Las yemas presentaron dos tipos de síntomas: “tizón de yemas” (*Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Phoma* sp.) y “cancro de yemas” (*Colletotrichum* sp.). La incidencia estacional de los síntomas se presenta en el Cuadro 1.

De los 12 géneros de hongos identificados en este estudio, 11 han sido reportados en arándano (Bristow y Milholland, 1995; Cline y Schilder, 2006; Dal Bello y Perelló 1998; Espinoza *et al.*, 2009; Hanlin, 2001; Milholland, 1995 a, b, c, d, e; Nickerson, 1995; Ramsdell, 1995b; Schilder, 2006; Schilder, 2008; Sisterna *et al.*, 2009;

*albopunctata* (Milholland, 1995d), *Botryosphaeria* sp., *Pestalotiopsis* sp., (Espinoza *et al.*, 2009). It is important to know the blueberry diseases in commercial orchards in Michoacan, Mexico in order to establish control and management strategies that contribute to improve the productivity. The aim of this research was to identify morphologically, at genus level, the fungi associated to blueberry leaves, stems and fruits and to determine their seasonal incidence at Los Reyes, Michoacan. This is just a preventative and exploratory research to start with the formal study of the most important blueberry diseases.

The diseased material collections were made from 2009 to 2010 during spring, autumn and winter seasons, and they were suspended during summer because of the pruning time. Seasonal incidence was determined for each of the symptoms identified in three collection sites (Orchards: El Barreno, La Alameda and La Loma) with a 5% sample size of the total plants in the population (7 ha). The collected samples were processed in the lab using common techniques (Agrios, 2005) for isolation of fungi in PDA (Bioxon®) and incubated at room temperature. Fungi identification was done based on characteristics such as shape, color and appearance of the mycelial colonies and form of the reproductive structures; always with help of specialized literature (Barnett and Hunter, 1998; Crous *et al.* 2006; Hanlin, 2001; Maharachchikumbura *et al.* 2011; Wikee *et al.*, 2011).

From collected samples, 12 fungi were identified associated to the aerial part of the blueberry. In fruits, two types of symptoms were observed: "dry rot" (*Alternaria* sp.) and "soft rot" (*Colletotrichum* sp.). In leaves, five symptomatology were observed: "silver stain" (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp., and *Stemphyllium* sp.), "copper stain" (*Colletotrichum* sp., *Phyllosticta* sp.), "leaf blight" (*Colletotrichum* sp.,

Cuadro 1. Incidencia estacional de los síntomas en órganos aéreos de plantas de arándano durante el periodo 2009 - 2010 en Los Reyes, Michoacán.

Table 1. Seasonal incidence of symptoms in aerial organs of blueberry plants during the 2009 - 2010 in Los Reyes, Michoacan.

Enfermedad	Incidencia (%) <sup>z</sup>		
	Primavera	Otoño	Invierno
Cáncer de yemas	0.86	1.44	1.63
Cancro del tallo	36.72	41.26	37.06
Costra del tallo	32.97	13.00	6.76
Mancha cobriza	11.58	4.86	3.96
Mancha marrón	9.80	7.60	10.62
Mancha plateada	90.00	54.00	55.48
Pudrición seca de fruto	1.03	3.40	2.08
Pudrición suave de fruto	0.00	1.94	1.95
Roya	100.00	88.62	64.57
Tizón de yemas	1.78	4.75	3.96
Tizón del tallo	24.72	18.40	36.13
Tizón foliar	0.00	25.74	8.62

<sup>z</sup> Porcentaje de las sintomatologías observadas en el 5% (2450 plantas) de la población muestreada.

Szmagara, 2009; Wharton); solamente el género *Chaetomium* no ha sido aislado de este cultivo en trabajos similares.

De los síntomas descritos, la roya de la hoja registró la mayor incidencia estacional. Se ha señalado (Bristow y Strech, 1995) que esta enfermedad puede provocar defoliaciones intensas que reducen la producción del cultivo en el año siguiente. En este estudio, el daño de la roya al arándano sólo se observó como una defoliación parcial de los arbustos. Por otro lado, el cancro del tallo se presentó con una incidencia de hasta 41 %, con la frecuente presencia de *Neofusicoccum*. En otros estudios, el cancro del tallo ha sido atribuido a *Phomopsis* (Wilcox, 1939; Weingartner y Klos, 1974). De igual forma, *Pestalotiopsis* (Espinoza *et al.*, 2009) y *Phoma* (Szmagara, 2009) se han reportado causando tizón del tallo del arándano, por lo que su presencia se debe considerar a fin de determinar su importancia en el desarrollo de esta enfermedad. Otros hongos aislados del follaje del arándano fueron *Bipolaris*, *Curvularia*, *Phyllosticta* y *Stemphyllium*. *Phyllosticta* se señala atacando otras especies de *Vaccinium* (Szmagara, 2009) en las que provoca pudrición del fruto (Oudemans *et al.*, 1998). En este trabajo, *Phyllosticta* fue aislado de la "mancha cobriza". *Bipolaris*, *Curvularia* y *Stemphyllium* ya han sido reportados causando síntomas similares a los observados en este estudio (Cline y Schilder, 2006); sin embargo, la incidencia de las enfermedades a las que estos patógenos estuvieron asociados fue baja. El cancro de yemas lo describió Milholland (1974), quien lo atribuyó a *Gloeosporium minus*; en esta investigación, del cáncer de yemas se aisló a *Colletotrichum*. A *Chaetomium* se le ha señalado causando pudriciones de madera en cultivos ornamentales (Alexopoulos *et al.*, 1996), aunque es reconocida su condición de saprófito (Crous *et al.*, 2009). Las cepas de todos los hongos aislados se conservan en viales con agua destilada estéril, bajo condiciones de refrigeración (4 °C) en el Laboratorio de Fitopatología II de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la UMSNH.

## CONCLUSIONES

En las hojas se presentaron cinco síndromes, donde destacó la roya por su incidencia. En el tallo se encontraron cuatro sintomatologías, con la mayor incidencia para el cancro del tallo. En general, todas las sintomatologías observadas se presentaron en las tres estaciones de muestreo, con excepción de la pudrición suave de fruto y el tizón foliar, los cuales no se presentaron durante la primavera. De las 12 sintomatologías identificadas en los órganos del arándano analizados, *Colletotrichum* se encontró asociado a nueve y *Alternaria* a cuatro de ellas.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo el apoyo económico para el desarrollo del presente trabajo a través del proyecto de investigación 15.4 "Diagnóstico de las enfermedades fungosas del arándano en Michoacán y búsqueda de fuentes de resistencia genética al patógeno de

*Pestalotiopsis* sp.), "brown stain" (*Colletotrichum* sp.) and rust (*Pucciniastrum* sp.). Regarding the stems, three diseases were detected, among them the "stem blight" (*Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp.) "stem scab" (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp.) and "canker" (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Neofusicoccum* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp.). The buds showed two types of symptoms: "bud blight" (*Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Phoma* sp.) and "bud canker" (*Colletotrichum* sp.). The seasonal incidence of symptoms is presented in Table 1.

From the 12 fungi genus identified in this study, 11 have already been reported in blueberries (Bristow and Milholland, 1995; Cline and Schilder, 2006; Dal Bello and Perelló 1998; Espinoza *et al.*, 2009; Hanlin, 2001; Milholland, 1995 a, b, c, d, e; Nickerson, 1995; Ramsdell, 1995b; Schilder, 2006; Schilder, 2008; Sisterna *et al.*, 2009; Szmagara, 2009; Wharton), and only *Chaetomium* genus has not been isolated and reported on previous studies.

From the symptoms described, the leaf rust had the highest seasonal incidence. It has been previously reported (Bristow and Stretch, 1995) that this disease can cause severe defoliation that reduces the crop production in the following year. In this study, the damage caused by rust to blueberries was only observed as partial shrubs defoliation. On the other hand, stem canker was observed with an incidence of up to 41 %, with frequent *Neofusicoccum* occurrence. In other reports, stem canker has been attributed to *Phomopsis* (Wilcox, 1939; Weingartner and Klos, 1974). Similarly, *Pestalotiopsis* (Espinoza *et al.*, 2009) and *Phoma* (Szmagara, 2009) have been reported causing blueberry stem blight; therefore, their presence should be considered in order to determine their importance in the development of this disease. Other fungi isolated from blueberry leaves were *Bipolaris*, *Curvularia*, *Phyllosticta* and *Stemphyllium*. *Phyllosticta* has been observed attacking other *Vaccinium* species (Szmagara, 2009) that causes fruit rot (Oudemans *et al.*, 1998). In this work, *Phyllosticta* was isolated from the "copper stain". *Bipolaris*, *Curvularia* and *Stemphyllium* have already been reported causing similar symptoms to those reported in this study (Cline and Schilder, 2006); however, the incidence of diseases that were associated with these pathogens was low. Buds canker was described by Milholland (1974) and he attributed it to *Gloeosporium minus*; in this research, *Colletotrichum* was isolated from buds canker. *Chaetomium* has been considered the cause of wood rot in ornamental crops (Alexopoulos *et al.*, 1996), although its saprophyte capacity has also been recognized (Crous *et al.*, 2009). Strains of all isolated fungi were preserved in vials with sterile distilled water under refrigeration (4 °C) in the laboratory of Plant Pathology II at "Presidente Juárez" Agrobiology Faculty (UMSNH).

## CONCLUSIONS

Five symptomatologies were observed in the blueberry leaves, and rust had the highest incidence. Four symptomatologies were found on the stems and stem canker had the highest incidence. In general, all observed symptomatologies were present in the three sampling seasons, except fruit soft rot and leaf blight, which did not

mayor importancia económica”.

#### LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. 921 p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. Fourth Edition. John Wiley & Sons. Hoboken, New York, USA. 880 p.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn., USA. 218 p.
- Bristow, P.R., and Milholland, R.D. 1995. Botrytis blight. pp. 8-9. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press, St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Bristow, P.R., and Strech, A.W. 1995. Leaf rust. pp. 20-22. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press, St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Cline, W.O., and Schilder, A. 2006. Identification and control of blueberry diseases. pp.115-138. In: N.F. Childers and P.M. Lyrene, (eds.). Blueberries for growers, gardeners, and promoters. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose, Florida, USA. 266 p.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology. 55: 235-253.
- Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., and Samson, R.A. 2009. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. The Netherlands. 269 p.
- Dal Bello, G. y A. Perelló. 1998. First report of leaf rust of blueberry caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Argentina. Plant Disease. 82: 1062.
- Espinoza, J.G., Briseño, E.X., Chávez, E.R., Úrbez-Torres, J.R., and Latorre, B.A. 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. Plant Disease 93:1187-1194.
- Hanlin, R.T. 2001. Combined keys to illustrated genera of Ascomycetes 1 and 2. Fifth Printing. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 113 p.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 2004. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Primera Reimpresión. UNAM. Fondo de Cultura Económica. México D. F. 551 p.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Choakeitirote, E., Bahkali, A. H. and Hyde, K. D. 2011. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity 50: 167-187
- Milholland, R.D. 1974. Blueberry stem canker and dieback caused by *Gloeosporium minus*. Phytopathology 64:727-730.
- Milholland, R.D. 1995a. Anthracnose fruit rot (ripe rot). p. 17. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Milholland, R.D. 1995b. Double spot. pp. 17-18. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Milholland, R.D. 1995c. *Gloeocercospora* leaf spot. p. 18. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Milholland, R.D. 1995d. Septoria leaf spot and stem canker. p. 16. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Milholland, R.D. 1995e. Stem blotch. p. 19. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Nickerson, N.L. 1995. Leaf rust. p. 27. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Oudemans, P.V., Caruso F.L., and Stretch, A.W. 1998. Cranberry fruit rot in the Northeast: a complex disease. Plant Disease 82:1176-1184.
- Ramsdell, D.C. 1995. Fusicoccum canker (Godronia canker). P 15. In: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). Compendium of blueberry and cranberry diseases. APS Press. St. Paul, Minn., USA. 87 p.
- Sisterna, M., Pérez, B.A., Divo de Sesar, M., and Wright, E. 2009. Blueberry blight caused by *Bipolaris cynodontis* in Argentina. Plant Pathology 58:399.
- Szmagara, M. 2009. Biodiversity of fungi inhabiting de highbush blueberry stems. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 8:37-50.
- Weingartner, D.P., and Klos, E.J. 1974. Etiology and symptomatology of canker and dieback diseases on highbush blueberry caused by *Godronia (Fusicoccum) cassandre* and *Diaporthe (Phomopsis) vaccinii*. Phytopathology 65:105-110.
- Wharton, P. S., and Schilder, A. C. 2008. Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. Plant Pathology 57: 122-134.
- Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P. W., Chuakeitirote, E., Mcjenzie, E. H. C., Bahkali, A. H., Dai, D. and Hyde, K. D. 2011. *Phyllosticta*- an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity 51: 43-61
- Wilcox, M. S. 1939. *Phomopsis* twig blight of blueberry. Phytopathology 29:136-142.

appear during spring. From the 12 identified symptomatologies in the blueberry organs analyzed, *Colletotrichum* was associated to nine of them and *Alternaria* only to four of them.

**Acknowledgements.** Authors would like to thank to the “Coordination of Scientific Research” at the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo for the financial support to develop this work through the research project 15.4 "Diagnosis of blueberry fungal diseases in Michoacan and search for sources of genetic resistance to the pathogen of major economic importance".



## Diversidad de Hongos en Semilla de Trigo de Temporal

### Diversity of Fungi in Grain of Wheat of Temporary

**Emma Sandoval Martínez, Santos Gerardo Leyva Mir**, UACH, Parasitología Agrícola, Carr. México- Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México. **Héctor Eduardo Villaseñor Mir, María Florencia Rodríguez García**, INIFAP-CEVAMEX, Km. 13.5 Carr. Los Reyes- Texcoco, Coatlínchán, Texcoco, Edo. de México, CP 56250, México. **Luis Antonio Mariscal Amaro**, INIFAP-CEBAJ, Km. 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, CP 38110, México. Correspondencia: mariscal.luis@inifap.gob.mx.

(Recibido: Marzo 27, 2012 Aceptado: Junio 23, 2012)

Sandoval Martínez, E., Leyva Mir, S. G., Villaseñor Mir, H. E., Rodríguez García M. F. y Mariscal Amaro, L. A. 2012. Diversidad de hongos en semilla de trigo de temporal. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:145-149

**Resumen.** El estudio tuvo como objetivo de identificar y cuantificar la incidencia y frecuencia de hongos en semilla de trigo de temporal en los Valles Altos de México. La semilla se colectó en los ciclos primavera-verano 2009 y 2010 en 10 localidades de los estados de México, Puebla y Tlaxcala. Se cuantificó la incidencia y frecuencia de cada especie por el método de Freezing Blotter. Se identificaron 11 especies reportadas como patógenas: *Curvularia* sp., *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *Helminthosporium cynodontis*, *H. sativum* y *Microdochium nivale*; la especie con mayor frecuencia fue *F. graminearum* con 4 % y la mayor incidencia de especies fue en Chapingo y Puebla en 2009 y Tlaxcala en 2010.

Palabras clave adicionales: Frecuencia, incidencia, porciento, temporal, *Triticum aestivum*.

Con la movilización del trigo (*Triticum aestivum* L.) de una región a otra del país, se pueden transportar organismos que llegarían a ocasionar serios problemas al cultivo en campo o podrían afectar la calidad al procesar la semilla (grano). En México, anualmente, se movilizan alrededor de 3.6 millones de t de semilla de trigo de las regiones de producción a los centros de procesamiento (CANIMOLT, 2010). Los hongos transmitidos por semilla pueden sobrevivir hasta 10 años como esporas o estructuras de reposo dentro y sobre la semilla (OMAFRA, 2009); por lo tanto son fuente de inóculo para el siguiente ciclo de cultivo. En campo, la semilla es invadida por hongos como *Fusarium* spp., y *Helminthosporium* spp., que causan enfermedades de importancia agrícola (Fakhrunnisa y Ghaffar, 2006). Ivic *et al.* (2009) encontraron que 5 al 69 % de las semillas de trigo estaban contaminadas con varias especies de *Fusarium* causantes de pudriciones de raíz y tallo, y además productoras de toxinas nocivas. En almacén,

**Abstract.** This study was done with the aim to identify and quantify the incidence and prevalence of fungi in rainfed wheat seed in the high valleys of Mexico. The seed was collected during spring-summer 2009 and 2010 in 10 locations of Mexico, Puebla and Tlaxcala states. The incidence and frequency of each species was quantified by the Freezing Blotter method. Eleven reported pathogenic species were identified and reported: *Curvularia* sp., *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *Helminthosporium cynodontis*, *H. sativum* and *Microdochium nivale*; the most common species was *F. graminearum* with 4 % and the highest species incidence was in Chapingo and Puebla in 2009 and Tlaxcala in 2010.

Additional Keywords: Frequency, incidence, percentage, rainfed, *Triticum aestivum*.

With wheat (*Triticum aestivum* L.) mobilization from one region to another inside the country, organisms that might cause serious problems could be transported and originate serious harms to the crop in the field or could affect the quality when processing the seed (grain). In Mexico, approximately 3.6 million tons of wheat seed are mobilized annually from production areas to processing centers (CANIMOLT, 2010). Fungi transmitted by seed can survive up to 10 years as spores or resting structures inside or outside the seed (OMAFRA, 2009); therefore, seeds are a source of inoculum for the next crop cycle. In the field, the seed is invaded by fungi such as *Fusarium* spp. or *Helminthosporium* spp., which can cause diseases of agricultural importance (Fakhrunnisa and Ghaffar, 2006). Ivic *et al.* (2009) found that 5 to 69 % of wheat seeds were contaminated with several *Fusarium* species causing root and stem rot, and also producing harmful toxins. During storage, the seed can be invaded mainly by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., which can cause rotting, decline in physical quality, reduce germination, produce discoloration, cause other biochemical changes as well as synthesis of harmful toxins (Fakhrunnisa and Ghaffar, 2006). In the

la semilla es invadida principalmente por *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp., que ocasionan pudriciones, disminución de la calidad física, reducen la germinación, producen decoloraciones, ocasionan otros cambios bioquímicos, y sintetizan toxinas nocivas (Fakhrunnisa y Ghaffar, 2006). En campo, los daños por hongos transmitidos por semilla son la disminución del porcentaje de germinación y emergencia, muerte de plántulas poco después de la germinación, y las que sobreviven tienen menor vigor y son susceptibles a otras enfermedades (González y Trevathan 2000). En el año 2010, en los Valles Altos de México se produjo el 38 % de trigo bajo temporal (SIAP, 2011). Aunque en estas regiones se han reportado algunas epidemias esporádicas, poco se sabe de la diversidad de hongos que conviven con el cultivo de trigo en México lo que puede representar un problema a futuro (Gilchrist, 2000). Por la problemática anterior, en este estudio se planteó el objetivo de identificar la diversidad y cuantificar la incidencia de hongos en la semilla de trigo de temporal. En diez sitios se tomaron muestras de semilla de trigo sembrado en el ciclo primavera-verano (P-V) en 2009 y 2010 en los estados de México, Puebla y Tlaxcala. En 2010 se muestreó en dos fechas en el sitio Chapingo, Edo. de México (Cuadro 1). Algunas localidades históricamente han sido zonas trigueras. Cuando la semilla completó su madurez fisiológica, de cada parcela se colectó una muestra al azar de cinco espigas de plantas con síntomas de amarillamiento, marchites, manchado de hojas y espigas, etc. El tamaño de parcela fue de cuatro surcos espaciados a 0.30 x 11 m de largo. Las semillas se remojaron durante 3

field, damage by seed transmitted fungi are decrease of seed germination and emergence percentages, seedling death shortly after germination, and those who survive have less strength and are susceptible to other diseases (Gonzalez and Trevathan 2000). In 2010, in the Highlands of Mexico, 38 % of wheat was rainfed produced (SIAP, 2011). Although these regions have reported some sporadic epiphytotic, little is known about the diversity of fungi that live in the Mexican wheat cultivars which can be a problem in the future (Gilchrist, 2000). Due to the problematic mentioned above, the aim of this study was to identify the diversity and quantify the fungal incidence in rainfed wheat seed. Ten sites with wheat seed sown in the spring- summer (SS), 2009- 2010, in the states of Mexico, Puebla and Tlaxcala were sampled. In 2010, two samplings were done in Chapingo, Mexico State (Table 1). Some locations have historically been wheat areas. When the seed completed its physiological maturity, from each lot a random sample of five ears of plants with symptoms of yellowing, wilting, leaf spotting and spikes, etc. was collected. Lot size was four rows spaced at 0.30 x 11 m long. The seeds were soaked during 3 min in (3 %) sodium hypochlorite (to disinfect them) and they were rinsed with sterile distilled water three times. The Freezing Blotter method described by Warham *et al.* (1998) was used: 40 seeds per treatment (six replicates) spaced with a template on wet blotting paper in plastic containers. The containers were sealed with parafilm and incubated at 20 °C during 48 h (12 h white light and 12 h darkness). Later, they were on the freezer at -15 to -20 °C during 24 h to kill the embryo. Lastly, they were left at 20°C

Cuadro 1. Incidencia promedio en porcentaje de hongos patógenos identificados en semilla de trigo por año y por diez sitios durante los ciclos Primavera-Verano 2009 y 2010.

Table 1. Percent average incidence of fungal pathogens identified in wheat seed per year and ten sites during Spring-Summer 2009 and 2010.

Sitio	IP %		Especies identificadas
	2009	2010	
Estado de México			
Chapingo	15 a*	-	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. verticillioide</i> y <i>H. sativum</i>
Chapingo 1F	-	12 bc	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. verticillioide</i> y <i>H. sativum</i>
Chapingo 2F	-	2 cd	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. verticillioide</i> y <i>H. sativum</i>
Coatepec	8 ab	10 bc	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. verticillioide</i> , <i>H. cynodontis</i> y <i>H. sativum</i>
Juchitepec	5 b	16 b	<i>Curvularia</i> sp., <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. verticillioide</i> y <i>H. sativum</i>
Santa Lucía	10 ab	9 bcd	<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioide</i> , <i>H. cynodontis</i> y <i>H. sativum</i>
Puebla			
Cuyoaco	14 a	-	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioide</i> , <i>H. sativum</i> y <i>M. nivale</i>
Tlaxcala			
Francisco I. Madero	-	27 a	<i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>H. sativum</i> y <i>M. nivale</i>
Francisco Villa	-	4 cd	<i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioide</i> , <i>H. sativum</i> y <i>M. nivale</i>
Nanacamilpa	2 b	11 bc	<i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> y <i>F. verticillioide</i>
Terrenate	6 b	0 d	<i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> y <i>F. verticillioide</i>
Velasco	4 b	-	<i>Curvularia</i> sp., <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioide</i> , <i>H. sativum</i> y <i>M. nivale</i>

IP= incidencia promedio; 1F= primera fecha; 2F= segunda fecha; \*= agrupación Tukey, letras iguales en la misma columna son estadísticamente iguales. *F.* = *Fusarium*; *H.* = *Helminthosporium*; *M.* = *Microdochium*.

hipoclorito de sodio (3 %) para desinfectarlas y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Se utilizó el método de Freezing Blotter descrito por Warham *et al.* (1998): se colocaron 40 semillas por tratamiento (seis repeticiones) espaciadas con una plantilla sobre papel secante húmedo en contenedores de plástico. Se sellaron los contenedores con parafilm, se incubaron a 20 °C por 48 h (12 h luz blanca y 12 h oscuridad). Posteriormente, se colocaron en el congelador a temperatura de -15 a -20 °C por 24 h para matar el embrión. Finalmente se dejaron a 20 °C por diez días. La identificación de los hongos se realizó considerando las características morfológicas de las colonias (forma, tamaño y color), y con preparaciones temporales del micelio y estructuras de reproducción, con ayuda de un microscopio compuesto. Las colonias, micelio y estructuras reproductivas se caracterizaron con base a Zillinsky (1984), Wiese (1987), Warham *et al.* (1998) y Leslie y Summerell (2006). Se contabilizó el número de semillas sin hongos (sanas), con hongos patógenos y con saprófitos, según lo reportado por la literatura, para todos los sitios muestreados y se obtuvo el porcentaje de incidencia; se hizo un análisis por SAS (Statistical Analysis System) y prueba de comparación de medias Tukey ( $p = 0.05$ ) (Castillo, 2003). También del total de semillas obtenidas por muestra y por sitio, se obtuvo la frecuencia de las diferentes especies de hongos identificadas.

En el ciclo P-V 2009 se identificaron 11 especies reportadas como patógenas y en el ciclo P-V 2010, se identificaron nueve especies (Cuadro 1). Los sitios con

during ten days. The identification was made considering the morphological characteristics of the colonies (shape, size and color), and with temporary mycelium preparations and reproductive structures, with help of a compound microscope. The colonies, mycelium and reproductive structures were characterized based on Zillinsky (1984), Wiese (1987), Warham *et al.* (1998) and Leslie and Summerell (2006). According to literature, the number of seeds without fungi (healthy), with fungal pathogens and saprophytes was registered for all sites sampled and the incidence percentage was obtained; SAS (Statistical Analysis System) analysis was performed as well as Tukey mean comparison ( $p = 0.05$ ) (Castillo, 2003). Also from the total number of seeds obtained by sample and place, the frequency of the different species of fungi identified was obtained.

During 2009 S-S cycle, 11 species were identified and reported as pathogenic, and during 2010 S-S cycle, nine species were identified (Table 1). The sites with higher fungi incidence in 2009 were Chapingo, Mexico State and Cuyoaco, Puebla; and in S-S 2010 was Francisco I. Madero in Tlaxcala. The phytopathogenic fungi identified and their frequencies are listed in Figure 1. These species are the most common pathogens in wheat according to Zillinsky (1984), Wiese (1987) and Warham *et al.* (1998). The incidence of seed-borne fungi in a certain region is directly related to the stage of the plant in which they occur, the amount and rainfall distribution throughout the year (Villaseñor y Espita, 2000).

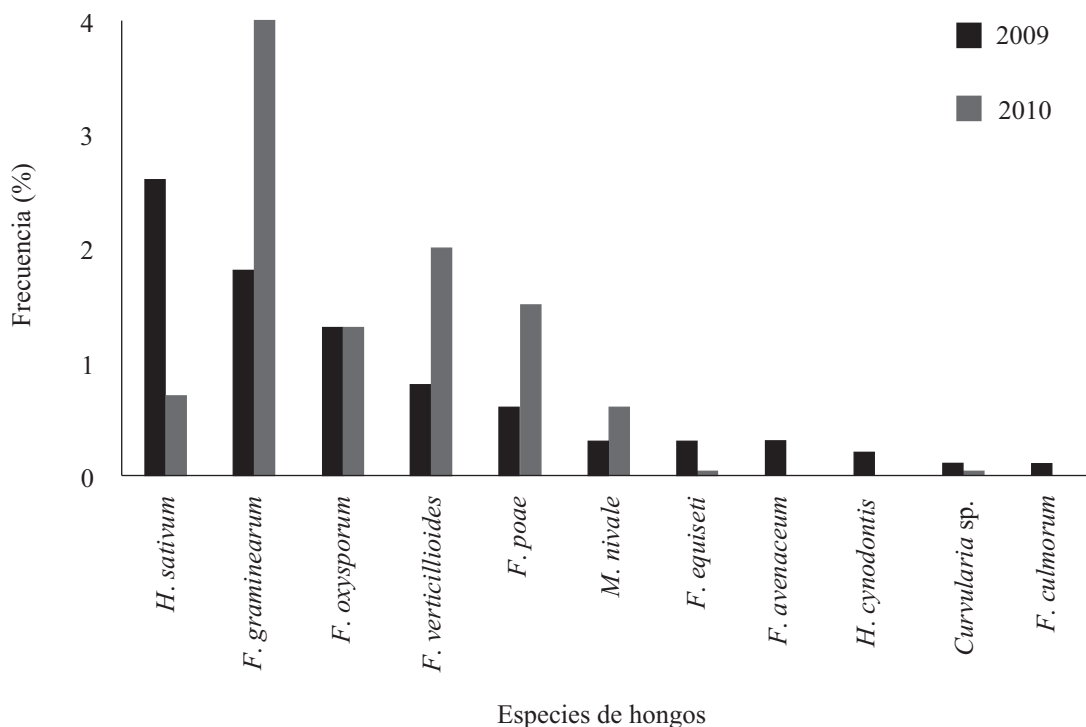


Figura 1. Frecuencia de hongos identificados en los sitios analizados en los ciclos Primavera-Verano 2009 y 2010.

*F.* = *Fusarium*; *H.* = *Helminthosporium*; *M.* = *Microdochium*.

Figure 1. Frequency of fungi identified in the analyzed sites during Spring-Summer 2009 and 2010.

*F.* = *Fusarium*, *H.* = *Helminthosporium*, *M.* = *Microdochium*.

mayor incidencia de hongos en 2009 fueron Chapingo, Estado de México y Cuyoaco, Puebla; y en P-V 2010 fue Francisco I. Madero en Tlaxcala. Los hongos fitopatógenos identificados y su frecuencia se enlistan en Figura 1. Estas especies son los patógenos más comunes en trigo según Zillinsky (1984), Weise (1987) y Warham *et al.* (1998). La incidencia de hongos transmitidos por semilla en una determinada región se relacionan directamente con la etapa de la planta en que se presentan, la cantidad y distribución de la precipitación durante todo el año (Villaseñor y Espita, 2000).

En 2010 predominaron cinco especies. *F. graminearum* Shw. Petch [*Gibberella zeae* (Schw.) Petch] se encontró con una frecuencia de 4 %. Este hongo se ha reportado en Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán y Tlaxcala (Ireta y Gilchrist, 1994) y es importante como patógeno porque produce las toxinas tricotecenos y zearalenona y se reporta que en un 5 % o más de granos infectados hay suficiente cantidad de toxina que puede causar daños al hombre y animales (Prescott *et al.*, 1986). Ivic *et al.* (2009) lo han reportado con frecuencias de 27 % en semilla de trigo y otros cereales, junto con *F. poae* y *F. oxysporum*; y en este estudio estas dos últimas especies se encontraron con frecuencias de 1.5 y 1.3 % respectivamente. La especie *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*Gibberella moniliformis* Wineland) se encontró con una frecuencia del 2 %. Este hongo ocasiona la pudrición de la mazorca del maíz en los Valles Altos (Pérez *et al.*, 2001). La especie *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I. C. Hallett., se encontró con una frecuencia de 0.6 %. Smiley *et al.* (2005) mencionan que es uno de los patógenos que ocasiona pudrición de la corona del trigo y Prescott *et al.* (1986) lo encontraron también en el Estado de México y Valle de Toluca. En 2009 fueron seis especies. *Helminthosporium sativum* P. K. & B., se encontró con la mayor frecuencia de 2.6 % en 2009. En Bangladesh, este hongo es causante de las enfermedades de mayor impacto económico del trigo causando decoloraciones y debilitamiento de plántulas y espigas, granos manchados y espigas estériles (Hossain y Azad, 1992). Las epidemias de *H. sativum* se presentan principalmente en países con climas cálidos y el estrés abiótico influye en el desarrollo y severidad del patógeno (Hudec, 2007). *Curvularia* sp., se encontró con una frecuencia menor al 1 %; Fakhrunnisa y Ghaffar (2006) lo encontraron con frecuencia alta en semillas de trigo. En Pakistán, este hongo junto con *Fusarium* spp., y *Helminthosporium* spp., han sido asociados a pudriciones de la raíz en trigo (Ahmad *et al.*, 2006). *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., se identificó con frecuencia menor al 1 %. Zillinsky (1984) reporta que *F. culmorum* y *F. equiseti* (Corda) Sacc (0.6 %) se ha reportado en cereales en la Meseta Central de México; por su parte Imathiu *et al.* (2010) señala que *F. culmorum* fue una de las especies más agresivas causante de tizón de plántulas en trigo y avena.

Existe una amplia diversidad de hongos en la semilla de trigo colectada en diferentes localidades de los Valles Altos de México. Las especies de hongos patógenos que pueden ser transmitidos por la semilla de trigo son

Shw. Petch [*Gibberella zeae* (Schw.) Petch] was found at 4 % frequency. This fungus has been reported in Hidalgo, Jalisco, Mexico, Michoacan and Tlaxcala (Iretas and Gilchrist, 1994) and it is important as a pathogen because it produces trichothecenes and zearalenone toxins and it is reported that in 5 % or more of infected kernels there is enough toxin able to cause damage to humans and animals (Prescott *et al.*, 1986). Ivic *et al.* (2009) reported it with 27 % frequency in wheat seeds and other cereals, together with *F. poae* and *F. oxysporum*; in the present study the latter two species were found with frequencies of 1.5 and 1.3 %, respectively. The *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*Gibberella moniliformis* Wineland) species is found at a 2 % frequency. This fungus causes ear rot of maize in the highlands (Perez *et al.*, 2001). The species *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I. C. Hallett., was found with a frequency of 0.6 %. Smiley *et al.* (2005) reported that this fungus is one of the pathogens that cause wheat crown rot and Prescott *et al.* (1986) also found it in Mexico State and Toluca Valley. In 2009 there were six species. *Helminthosporium sativum* P. K. & B., was found with the highest frequency of 2.6 % in 2009. In Bangladesh, this fungus is causing the highest economic impact diseases of wheat causing discoloration and weakening of seedlings and spikes, stained grains and sterile spikes (Hossain and Azad, 1992). *H. sativum* epidemics occur mainly in countries with warm climates, and abiotic stress influences the development and severity of the pathogen (Hudec, 2007). *Curvularia* sp., was found with a frequency less than 1 %; Fakhrunnisa and Ghaffar (2006) observed it very frequently in wheat seeds. In Pakistan, this fungus together with *Fusarium* spp., and *Helminthosporium* spp., has been associated with root rot in wheat (Ahmad *et al.*, 2006). *F. culmorum* (WG Sm.) Sacc., frequently identified less than 1 %. Zillinsky (1984) reported that *F. culmorum* and *F. equiseti* (Corda) Sacc (0.6 %) have been observed in cereals in the Central Plateau of Mexico; on the other hand, Imathiu *et al.* (2010) noted that *F. culmorum* was one of the most aggressive species causing seedling blight in wheat and oats.

There is a wide diversity of fungi on wheat seed collected at different locations in the Highlands of Mexico. Species of pathogenic fungi that can be transmitted by wheat seed are *Curvularia* sp. *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (0.6%), *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* (Peck) Wollenw, *F. verticillioides*, *H. cynodontis* Marignoni (0.3%), *H. sativum* and *M. nivale*. The species that appeared most frequently was *F. graminearum*. The incidence of fungal species in different sites differed from year to year because of the changing weather conditions. The presence of these reported fungal pathogens represent a potential danger to the crop as they could cause serious epiphytotics in the future.

**Acknowledgements.** This research was funded by FONDO SECTORIAL-SAGARPA-CONACYT, Project No. 146788.

#### LITERATURACITADA

Ahmad I, Iram S and Cullum J. 2006. Genetic variability and

*Curvularia* sp., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (0.6 %), *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. verticillioides*, *H. cynodontis* Marignoni (0.3%), *H. sativum* y *M. nivale*. La especie que se presentó con mayor frecuencia fue *F. graminearum*. La incidencia de las especies de hongos en los diferentes sitios difirió de un año a otro dado lo cambiante de las condiciones climáticas. La presencia de estos hongos reportados patógenos del trigo representa un peligro potencial para el cultivo ya que podrían ocasionar epifitas graves en el futuro.

**Agradecimientos.** Esta investigación fue financiada por el FONDO SECTORIAL-SAGARPA-CONACYT Proyecto No. 146788.

- aggressiveness in *Curvularia lunata* associated with rice-wheat cropping areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 38:475-485.
- Cámara Nacional de la Industria Molinera (CANIMOLT). 2010. Reporte Estadístico al 2010. *Revista Digital*. [www.canimolt.org/revista-canimol](http://www.canimolt.org/revista-canimol). (Consulta, noviembre 2012).
- Castillo LEM. 2003. Introducción a la Estadística Experimental. Cuarta edición. Universidad Autónoma Chapingo. 277p.
- Fakhrunnisa HMH and Ghaffar A. 2006. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan Journal of Botany* 38:185-192.
- Gilchrist SLI. 2000. Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:132-137.
- Gonzalez MS and Trevathan LE. 2000. Identity and pathogenicity of fungi associated with root and crown rot of soft red winter wheat grown on the upper coastal plain land resource area of Mississippi. *Journal of Phytopathology* 148:77-85.
- Hossain I and Azad K. 1992. Reaction of wheat to *Helminthosporium sativum* in Bangladesh. *Hereditas* 116:203-205.
- Hudec K. 2007. Pathogenicity of fungi associated with wheat and barley seedling emergence and fungicide efficacy of seed treatment. *Biologia* 62:287-291.
- Imathiu SM, Hare MC, Ray RV, Back M and Edwards SG. 2010. Evaluation of pathogenicity and aggressiveness of *F. langsethiae* on oat and wheat seedlings relative to known seedling blight pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 126:203-216.
- Ireta MJ y Gilchrist L. 1994. Roña o Tizón de la Espiga del Trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México, D. F. 25p.
- Ivic D, Domijan AM, Peraica M, Milicevic T and Cvjetkovic B. 2009. *Fusarium* spp., contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 60:435-442.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- OMAFRA, Ontario Ministry of Rural Affairs. 2009. *Diseases of Field Crops: Cereal Diseases*. In: Brown, C. (ed). *Agronomy Guide for Field Crops*. Publication 811. OMAFRA. Ontario, Canada. 300p.
- Pérez BD, Jeffers D, González LD, Khairallah M, Cortés CM, Velázquez CG, Azpiroz RS y Srinivasan G. 2001. Cartografía de QTL de la resistencia a la pudrición de la mazorca (*Fusarium moniliforme*) en maíz de Valles Altos, México. *Agrociencia* 35:181-196.
- Prescott JM, Burnett PA, Saari EE, Ransom J, Browman J, de Milliano W, Sing RP y Bekele G. 1986. *Enfermedades y Plagas de Trigo: una guía para su identificación de campo*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México, D. F. 135p.
- Servicio de Información y estadística Agroalimentaria y Pesca (SIAP). 2011. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). (Consulta, noviembre 2012).
- Smiley RW, Gourlie JA, Easley SA and Patterson LM. 2005. Pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in Oregon and Washington. *Plant Disease* 89:949-957.
- Villaseñor MHE y Espitia RE. 2000. *El trigo de temporal en México*. Chapingo, Estado de México. México. Libro Técnico No. 1. SAGAR-INIFAP-CIRCE-CEVAMEX. 315p.
- Warham E JL, Butler D y Sulton BC. 1998. *Ensayos para la Semilla de Maíz y Trigo: manual de laboratorio*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México. D. F. 84p.
- Wiese MV. 1987. *Compendium of Wheat Diseases*. The American Phytopathological Society. Second edition. 112p.
- Zillinsky FJ. 1984. *Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo. CIMMYT. México, D. F. 141p.

## Efecto de la Preparación del Suelo en la Dispersión de Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk

### Effect of Soil Preparation in Dispersion of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk

**Rodolfo Velásquez Valle, Manuel Reveles Hernández, María Mercedes Medina Aguilar**, INIFAP, Campo Experimental Zacatecas, Km. 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, CP 98500, México; **Mario Domingo Amador Ramírez**, Asesor del INIFAP en el Campo Experimental Zacatecas, Km. 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, CP 98500, México. Correspondencia: fitovalle58@yahoo.com.mx

(Recibido: Junio 05, 2012 Aceptado: Agosto 24, 2012)

---

Velásquez Valle, R., Reveles Hernández, M., Medina Aguilar, M. M. y Amador Ramírez, M.D. 2012. Efecto de la preparación del suelo en la dispersión de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Revista Mexicana de Fitopatología 30:150-154.

**Resumen.** La pudrición blanca del ajo es la principal enfermedad fungosa de este cultivo en Zacatecas, México. La mayoría de las parcelas con ajo se encuentran infestadas con esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, sin embargo, no existe información acerca de la influencia de las prácticas culturales previas a la siembra, sobre la dispersión de los esclerocios del patógeno. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de las prácticas culturales previas a la siembra, sobre la dispersión de esclerocios del hongo. En una parcela de 0.9 h con antecedentes de *S. cepivorum*, se tomaron 90 muestras de suelo a profundidades de 0 - 20 y 21-40 cm y se analizaron para contar el número de esclerocios antes y después de la preparación del suelo. Después de la preparación del suelo hubo un incremento del 30.3 % en el número de muestras con esclerocios en la capa de suelo más profunda y no hubo diferencia en número de esclerocios en la capa superior del suelo.

Palabras clave adicionales: movimiento de esclerocios, labores culturales, estratos del suelo.

La pudrición blanca es la enfermedad fúngica más importante del ajo (*Allium sativum* L.) en el Estado de Zacatecas, México. Entre las principales características del agente causal de la enfermedad (*Sclerotium cepivorum* Berk.), se encuentra la producción de esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo por periodos prolongados, aún sin la presencia de hospedantes de la familia Alliaceae, a la que pertenece el ajo (Metcalf *et al.*, 2004). En Zacatecas, en la mayoría de las parcelas dedicadas a la producción de ajo, la distribución de los esclerocios se determinó en manchones en el 60.8 % de las parcelas (Velásquez-Valle *et al.*, 2005); sin embargo, estos resultados

**Abstract.** The garlic white rot is the main fungal disease of this crop in Zacatecas, Mexico. Even if most garlic fields are infested with *Sclerotium cepivorum* sclerotia, there are no current reports about the influence of cultural practices prior to planting on the dispersal of sclerotia of the pathogen. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of cultural practices prior to planting on the dispersal of sclerotia of the fungus. From a 0.9 h field with a history of *S. cepivorum*, 90 soil samples were taken at depths ranging from 0 - 20cm (A) and from 21- 40 cm (B) and they were analyzed to count the number of sclerotia before and after soil preparation. After soil preparation there was a 30.3 % increase in the number of samples with sclerotia in the deeper soil layer and no difference in the number of sclerotia in the upper soil layer was observed.

Additional key words: Sclerotia movement, cultural practices, soil layers.

White rot is the most important garlic (*Allium sativum* L.) fungal disease in Zacatecas state, Mexico. Among the main characteristics of the causative agent of the disease (*Sclerotium cepivorum* Berk), is the production of sclerotia that can remain viable in the soil during long periods of time, even without the presence of Alliaceae family hosts, which garlic belongs to (Metcalf *et al.*, 2004). In most fields with garlic production in Zacatecas, the sclerotia distribution was determined to be in patches in 60.8 % of the fields (Velásquez-Valle *et al.*, 2005); however, these results were obtained by analysis of soil samples systematically taken from commercial garlic fields and they may not reflect the effect of garlic planting beds preparation. In Zacatecas the soil preparation process includes the moldboard disk plowing, disk harrowing, and marking for planting; it is common the double step of the harrow or an extra step with the roller for loosening the soil containing large lumps (Reveles *et al.*, 2009). It can be supposed that tillage most likely favors the movement of sclerotia of the pathogen

se obtuvieron por el análisis de muestras de suelo sistemáticamente tomadas de parcelas comerciales de ajo y pudieran no reflejar el efecto de la preparación de la cama de siembra de ajo. En Zacatecas el proceso de preparación del suelo incluye el barbecho, rastra y marcado para la siembra; es frecuente el doble paso de rastra o el paso adicional del rodillo de picos para mullir el suelo que presenta terrones grandes (Reveles *et al.*, 2009). Es previsible que la labranza propicie el desplazamiento de los esclerocios del patógeno, por lo que el propósito de este trabajo consistió en determinar el efecto de prácticas de preparación del suelo previas a la siembra, sobre la dispersión de esclerocios de *S. cepivorum*.

El trabajo se hizo en Chaparrosa, municipio de Villa de Cos, Zacatecas, durante septiembre de 2010, en una parcela comercial de 0.9 h, infestada con *S. cepivorum*. Se marcaron 90 puntos de muestreo equidistantes (10 m) y en cada uno se obtuvieron, con una pala, dos muestras de suelo de aproximadamente 500 g cada una, de 0-20 cm (A) y a 21-40 cm (B) de profundidad. El muestreo se hizo antes de preparar el suelo para la siembra de ajo y después de preparar el suelo (paso de arado de disco, dos pasos de rastra, nivelación y levantamiento de "camas") previo a la siembra. La profundidad de preparación del suelo se midió después del paso de arado de disco y varió de 25 a 35 cm. Una vez realizado el primer muestreo, se colocaron estacas en el perímetro de la parcela (cada 10 m), a fin de que sirvieran como referencia para llevar a cabo el segundo muestreo lo más cercano posible al punto donde se tomó cada muestra en el primer muestreo. En el laboratorio, los esclerocios se extrajeron y se contaron por la técnica del tamizado húmedo (Papavizas, 1972) en una sub-muestra de 30 g del suelo previamente homogenizado obtenido de cada una de las muestras. La viabilidad de los esclerocios se confirmó con la disección de esas estructuras bajo el microscopio de disección (VELAB, Mod. VE-SS, Alemania); se consideraron viables aquellos que al disectarlos mostraban un contenido de aspecto blanco-cremoso; los esclerocios inviables se fragmentaban al presionarlos con la aguja de disección y se encontraban huecos (Velásquez-Valle *et al.*, 2005), por lo tanto las cantidades de esclerocios que se reportaron en este trabajo representaron exclusivamente aquellos que conservaban su viabilidad. Para determinar si el número de esclerocios muestreados en los estratos A y B antes y después de preparar el terreno para la siembra diferían significativamente entre sí, los datos se sometieron a la prueba t de Student por el procedimiento PROC TTEST de SAS (2009). Se especificó la opción COCHRAN con el objeto de utilizar la aproximación del mismo nombre ( $\alpha = 0.05$ , 90 gl) para así descartar la posibilidad de que las distribuciones del número de esclerocios en los distintos estratos y etapas presentaban varianzas diferentes.

En el primer muestreo en el estrato superior se detectaron poblaciones variables de esclerocios de *S. cepivorum* en 77 de los 90 puntos de muestreo. El rango de esclerocios en las muestras varió de uno hasta cinco en cada 30 g de suelo; más del 60 % de las muestras presentaron uno o dos esclerocios (Cuadros 1 y 2). El promedio de esclerocios tomando en cuenta todas las muestras del perfil

present in the field, so the purpose of this study was to determine the effect of tillage practices prior to planting on the dispersion of *S. cepivorum* sclerotia.

This study was carried out in Chaparrosa, Villa de Cos municipality, Zacatecas state, during September 2010 in a commercial field of 0.9 h infested with *S. cepivorum*. Ninety equidistant (10 m) sampling points were labeled and from each of them, with a shovel, two soil samples of approximately 500 g each, from 0-20 cm (A) and 21-40 cm (B) depth were obtained. Sampling was done before preparing the soil for garlic planting and after preparing the soil (one pass of disk plough, two passes of disk harrow, leveling, and beds construction) before planting. The depth of soil preparation was measured after the disk harrow step and ranged from 25 to 35 cm. Once the first sampling was done, some poles were placed on the perimeter of the field (every 10 m), to serve as a reference for conducting the second sampling as close as possible to the point where each sample was taken in the first sampling. On the laboratory, sclerotia were extracted and counted by wet sieving technique (Papavizas, 1972) on a 30 g sub-sample of previously homogenized soil obtained from each of the samples. Sclerotia viability was confirmed by dissection of these structures under the dissecting microscope (VELAB, Mod VE-SS, Germany); viable sclerotia were considered those that after dissection showed a creamy-white content and non-viable sclerotia naturally fragmented upon pressure with the dissecting needle and were hollow (Velasquez-Valle *et al.*, 2005); therefore, sclerotia amounts reported in this study represent only the viable ones. In order to determine if the number of sclerotia sampled in A and B layers before and after soil preparation for planting differed significantly from each other, the data were subjected to Student's t test by SAS PROC TTEST (2009) procedure. COCHRAN option was used in order to use the approximation of the same name ( $\alpha = 0.05$ , 90 df), thus ruling out the possibility that the number of sclerotia distributions in the different layers and stages showed different variances.

In the first sampling (upper layer) variable populations of sclerotia of *S. cepivorum* were detected in 77 of the 90 sampling points. From one to five sclerotia were found per each 30 g of soil sample; more than 60 % of the samples showed one or two sclerotia (Tables 1 and 2). Considering only A soil profile samples, the sclerotia average was 35.3 sclerotia per kg of soil. In layer B, sclerotia were only found in 40 of the 90 sampling points. Sclerotia range in these samples varied from one to two sclerotia in the 40 positive samples; in 85 % of the positive samples only one sclerotium was found (Tables 1 and 2).

During the second sampling, variable sclerotia populations were detected in 85 of the 90 sampling points, which meant an increase of eight additional points in comparison to the first sampling; approximately 87 % of the samples in this sampling showed between one and three sclerotia. Number of samples with two or three sclerotia increased, and conversely, the number of samples with one single sclerotium decreased. These results are important because the recommendation for garlic planting fields is

Cuadro 1. Poblaciones de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en los estratos A (0-20 cm) y B (21-40 cm) antes y después de preparar el suelo para la siembra de ajo en una parcela de Villa de Cos, Zacatecas, México.

Table 1. Sclerotia populations of *Sclerotium cepivorum* in A (0-20 cm) and B (21-40 cm) soil layers before and after preparing the soil for planting garlic in a Villa de Cos field, Zacatecas, Mexico.

Estrato de suelo	Muestreo	Número de puntos de muestreo N/90		Rango de esclerocios en puntos de muestreo infestados
		Infestados <sup>y</sup>	No infestados <sup>z</sup>	
A	Previo <sup>w</sup>	77	13	1 - 5
B	Previo	40	50	1 - 2
A	Posterior <sup>x</sup>	85	5	1 - 4
B	Posterior	59	31	1 - 2

<sup>w</sup>Muestreo realizado antes de la preparación del suelo para la siembra; <sup>x</sup>Muestreo realizado después de la preparación del suelo para la siembra; <sup>y</sup>Punto de muestreo con al menos un esclerocio; <sup>z</sup>Punto de muestreo donde no se detectaron esclerocios.

A del suelo fue de 35.3 esclerocios por kg de suelo. En el estrato B solamente se encontraron esclerocios en 40 de los 90 puntos de muestreo. El rango de esclerocios en estas muestras osciló de uno a dos esclerocios en las 40 muestras positivas; en el 85 % de las muestras positivas solo se encontró un esclerocio (Cuadros 1 y 2).

En el segundo muestreo se detectaron poblaciones variables de esclerocios en 85 de los 90 puntos de muestreo, lo cual significó un aumento de ocho puntos adicionales con respecto al primer muestreo; aproximadamente el 87 % de las muestras en este muestreo mostraron entre uno y tres esclerocios. Se registró aumento en el número de muestras con dos y tres esclerocios y por el contrario disminuyó el número de muestras con un solo esclerocio. Los resultados anteriores son importantes ya que la recomendación para la

based on the average number of sclerotia found on the soil of a given field, consequently, if the range of these structures increases, it will be more likely to be considered as a non-appropriate field for planting garlic (Tables 1 and 2).

The average of sclerotia for the whole field was 38.4 per kg of soil, this value is statistically similar to the value obtained in the first sampling (35.3 sclerotia per kg of soil). There was also an increase in the lower layer, from 40 to 59 sampling points with at least one sclerotium; although the number of sampling points with a single sclerotium increased from 85 to 88.1 % between the first and second sampling, respectively (Tables 1 and 2).

During the second sampling, the number of total sclerotia increased in both layers, from 159 (pre-sampling) to 173 (subsequent sampling) in layer A (both values

Cuadro 2. Porcentaje de muestras de suelo con esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en dos estratos A (0-20 cm) y B (21-40 cm) antes y después de preparar el suelo para la siembra de ajo en una parcela en Villa de Cos, Zacatecas, México.

Table 2. Percentage of soil samples with *Sclerotium cepivorum* sclerotia in two soil layers A (0-20 cm) and B (21-40 cm) before and after preparing the soil for garlic planting in a Villa de Cos field, Zacatecas, Mexico.

Estrato	Muestreo	No. de esclerocios por muestra de suelo (30 g)				
		1	2	3	4	5
A	Previo <sup>x</sup>	33.8 <sup>z</sup>	38.9	15.6	10.4	1.3
B	Previo	85.0	15.0	0.0	0.0	0.0
A	Posterior <sup>y</sup>	28.2	42.3	27.0	2.33	0.0
B	Posterior	88.1	11.9	0.0	0.0	0.0

<sup>x</sup>Muestreo realizado antes de la preparación del suelo para la siembra; <sup>y</sup>Muestreo realizado después de la preparación del suelo para la siembra; <sup>z</sup>Porcentaje de muestras con un número dado de esclerocios.

siembra de parcelas con ajo se fundamenta en el número promedio de esclerocios encontrados en el suelo de una parcela dada, consecuentemente, si el rango de esas estructuras aumenta será más probable que la parcela sea dictaminada como no apropiada para la siembra de ajo (Cuadros 1 y 2).

El promedio de esclerocios para la parcela completa fue de 38.4 por kg de suelo, valor estadísticamente similar al obtenido en el primer muestreo (35.3 esclerocios por kg de suelo). En el estrato inferior también aumentó, de 40 a 59 puntos de muestreo con al menos un esclerocio; aunque el

not statistically different) and by contrast in layer B, the number of total sclerotia varied from 46 (pre-sampling) to 66 (subsequent sampling), which was statistically different and, consequently, from 205 to 239 considering both layers combined (Table 3). In terms of percentage, it seems more important the increase in layer B, 30.3 % in the sclerotia population, whereas in layer A the increase was close to 8.1 %; considering both layers of the field, there was a 14.2 % increase in sclerotia detected.

The percentage increase of the total number of sclerotia in the field (between the two samplings) wouldn't



número de puntos de muestreo con solo un esclerocio aumentó de 85 a 88.1 % entre el primero y segundo muestreo respectivamente (Cuadros 1 y 2).

Durante el segundo muestreo se incrementó en ambos estratos el número de esclerocios totales detectados; de 159 (muestreo previo) a 173 (muestreo posterior) en el estrato A, ambos valores no fueron estadísticamente diferentes. En cambio, en el estrato B el número de esclerocios pasó de 46 (muestreo previo) a 66 (muestreo posterior), lo cual resultó estadísticamente diferente y, por consecuencia, de 205 a 239 considerando ambos estratos en

seem important, as sclerotia concentration already highly exceeds the recommended limit that the Zacatecas Experimental Field (Reveles-Hernández *et al.*, 2009) sets for garlic planting in a specific field, on which it is suggested that if the sclerotia population in soil is higher than 20 per kg of soil then planting garlic is not recommended. However, this percentage (14.2 %) in other fields can be the difference between planting garlic or an alternative crop like oats or barley which are winter resistant or leaving the field uncultivated. These last two options also mean losses for garlic or onion producers.

Cuadro 3. Resultados de la prueba de t de Student ( $\alpha=0.05$ ) practicada al número de esclerocios presentes en dos estratos A (0-20 cm) y B (21-40 cm) antes y después de preparar el suelo para la siembra de ajo en una parcela en Villa de Cos, Zacatecas, México.

Table 3. Student's test results ( $\alpha=0.05$ ) from the number of sclerotia present in two layers A (0-20 cm) and B (21-40 cm) before and after preparing the soil for garlic planting in a Villa de Cos field, Zacatecas, Mexico.

Estrato	Muestreo		Significancia	
	Previo <sup>x</sup>	Posterior <sup>y</sup>	Valor calculado	Valor de tablas
A	159 <sup>z</sup>	173	-0.98	1.98 (NS)
B	46	66	-2.22	0.98 *

<sup>x</sup>Muestreo realizado antes de la preparación del suelo para la siembra; <sup>y</sup>Muestreo realizado después de la preparación del suelo para la siembra; <sup>z</sup>Número de esclerocios en las 90 muestras analizadas.

NS = no significativo

\* significativo

conjunto (Cuadro 3). En términos de porcentaje parece más importante el aumento registrado en el estrato B, 30.3 % en la población de esclerocios, mientras que en el estrato A dicho incremento fue cercano a 8.1 %; considerando ambos estratos de la parcela, el crecimiento en el número de esclerocios detectados resultó de 14.2 %.

El incremento porcentual en el número total de esclerocios en la parcela entre ambos muestreos pareciera no ser importante ya que la concentración de esclerocios sobrepasa ampliamente el umbral de recomendación que utiliza el Campo Experimental Zacatecas (Reveles-Hernández *et al.*, 2009) para recomendar la siembra de ajo en una parcela específica, en la cual se sugiere que si la población de esclerocios en el suelo es mayor a 20 por kg de suelo no se recomienda la siembra de ajo. Sin embargo, dicho porcentaje (14.2 %) en otras parcelas puede ser la diferencia entre sembrar ajo o un cultivo alternativo como avena o cebada que soporte la temporada invernal o dejar la parcela en descanso; las dos últimas opciones significan también pérdidas para los productores de ajo o cebolla.

Por otro lado, el incremento de 30.3 % en el número de esclerocios en el estrato B en el segundo muestreo fue por un depósito profundo de estas estructuras, alejadas de las raíces de ajo, durante una parte considerable del ciclo de cultivo a una profundidad (16 cm) donde ocurren pocas infecciones como lo han mencionado Crowe y Hall (1980). Es posible que la acumulación de esclerocios en el estrato B pueda derivar en la formación de un "banco" de esclerocios que podrían alcanzar rápidamente el estrato A

On the other hand, the 30.3 % increase in the sclerotia number of layer B in the second sampling, was due to a deep reservoir of these structures away from garlic roots, during a considerable part of the growing season in a depth (16 cm) where few infections occur as reported previously by Crowe and Hall (1980). It is possible that sclerotia accumulation in layer B could lead to the formation of a sclerotium "bank" that quickly could reach layer A because of the potential upward movement of sclerotia contaminated soil aggregates and induced by tillage practices (such as subsoiling which is predominant in this region of Zacatecas), however, this hypothesis needs to be confirmed directly in the field.

From both samplings it can be concluded that layer A has the highest sclerotia population of this pathogen, which is consistent with Adams (1981) reports, who pointed out that the majority of the population is located in the upper soil layer (20-25 cm) which moves during tillage. In Zacatecas, garlic production tends to be cultivated with drip irrigation; therefore, it is most likely that the roots grow on the upper soil layer (25-30 cm) which is the layer that concentrates the sclerotia population.

In layer B, the number of sampling points with sclerotia and their concentration increased after pre-planting cultivation work. These are important observations for disease control since if it is demonstrated that no upward movement of sclerotia through cultivation work such as subsoiling or deep fallow happen, and that sclerotia are deposited deeply (far from garlic roots), then the sclerotia population on the top soil could be reduced using repeated

por el potencial movimiento ascendente de agregados del suelo contaminados con esclerocios y provocado por labores de cultivo como el sub-soleo que es frecuente en esta región de Zacatecas, sin embargo, es necesario corroborar en campo esta hipótesis.

En los muestreos se determinó que fue en el estrato A, donde se concentró la población de esclerocios de este patógeno, lo cual concuerda con lo señalado por Adams (1981), quien señaló que la mayor parte de dicha población se localiza en la capa superior del suelo (20-25 cm) misma que se mueve durante estas labores culturales. En Zacatecas la producción de ajo tiende a realizarse en riego por goteo, de ahí que es probable que la mayor parte de las raíces se desarrollen en la capa superficial (25-30 cm) del suelo, donde se concentra la población de esclerocios.

En el estrato B, se incrementó el número de puntos de muestreo con esclerocios y su concentración, después de las labores culturales de pre-siembra. Esto es importante para el manejo de la enfermedad ya que de comprobarse que no existe el movimiento ascendente de esclerocios por medio de labores culturales como el sub-soleo o barbecho profundo y que los esclerocios quedan depositados profundamente (fuera del alcance de las raíces de ajo) entonces la población de esclerocios en la capa superior del suelo podría ser reducida empleando pasos repetidos de barbecho o rastra, especialmente en aquellas parcelas donde la incidencia de la enfermedad es generalizada.

#### CONCLUSIONES

Hubo un incremento en el número de puntos de muestreo de suelo infestados con esclerocios de *S. cepivorum*, después de las labores de preparación del suelo para la siembra de ajo.

El número de esclerocios permaneció sin cambio en el estrato superior y se incrementó en el estrato inferior después de las labores de preparación del suelo.

#### LITERATURACITADA

- Adams PB. 1981. Forecasting onion white rot disease. *Phytopathology* 71:1178-1181.
- Crowe FJ and Hall DH. 1980. Vertical distribution of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and host root systems relative to white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70:70-73.
- Metcalf DA, Dennis JJC and Wilson CR. 2004. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Disease* 88:287-291.
- Papavizas GC. 1972. Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. *Phytopathology* 62:545-549.

fallow or harrow steps, especially in fields where the incidence of the disease is widespread.

#### CONCLUSIONS

There was an increase in the number of soil sampling points infested with *S. cepivorum* sclerotia after soil cultivation work for garlic planting.

Sclerotia number remained unchanged in the upper layer (A) and it increased in the lower layer (B) after soil cultivation work.

- 
- Reveles-Hernández M, Velásquez-Valle R y Bravo-Lozano AG. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. Campo Experimental Zacatecas-INIFAP. Libro Técnico No. 11. Calera de Victor Rosales, Zacatecas, México. 272 p.
- Velásquez-Valle R, Amador-Ramírez MD y Medina-Aguilar MM. 2005. Distribución espacial de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. en cinco municipios de Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:262-267.

# Detección de Infecciones Mixtas Causadas por Begomovirus y Curtovirus en Plantas de Chile para Secado en San Luis Potosí, México

## Detection of Mixed Infections Caused by Begomovirus and Curtovirus in Chili pepper for drying plants in San Luis Potosi, Mexico

**Luis Roberto Reveles Torres, Rodolfo Velásquez Valle**, INIFAP-Campo Experimental Zacatecas, Km. 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo. Apdo. Postal # 18. Calera de V. R., Zacatecas, México. CP 98500, México; **Jorge Armando Mauricio Castillo**, Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zacatecas, México CP 98000, México; y **Silvia Salas Muñoz**, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P., México, CP 78216, México. Correspondencia: velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx

(Recibido: Junio 08, 2012 Aceptado: Septiembre 24, 2012)

Reveles Torres, L. R., Velásquez Valle, R., Mauricio Castillo, J. A. y Salas Muñoz, S. 2012. Detección de infecciones mixtas causadas por begomovirus y curtovirus en plantas de chile para secado en San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:155-160.

**Resumen.** Las infecciones virales son una de las enfermedades más importantes del chile para secado en el Norte Centro de México. Las infecciones virales mixtas son comunes en plantas de chile a nivel mundial, sin embargo, en San Luis Potosí, México se carece de información acerca de curtovirus y begomovirus infectando plantas de chile, por lo que el objetivo del presente estudio fue obtener información sobre la presencia de geminivirus infectando plantas de chile para secado que mostraban una sintomatología común. Se colectaron diez plantas de chile (*Capsicum annuum* "Mirasol") que mostraban síntomas típicos de amarillamiento y se analizaron mediante técnicas moleculares para detectar la presencia de begomovirus y curtovirus. Con respecto a curtovirus, se encontró al *Beet mild curly top virus* (BMCTV) en todas las muestras analizadas, mientras que los begomovirus *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) se encontraron en ocho y diez del total de muestras colectadas respectivamente. Cabe resaltar que en solo dos de las diez muestras la presencia de PepGMV no estuvo relacionada con PHYVV.

Palabras clave adicionales: Amarillamiento, Infección viral mixta, Geminivirus, Detección molecular.

Uno de los principales problemas que afectan al cultivo de chile para secado (*Capsicum annuum* L.) en el Norte Centro de México, que incluye el altiplano del estado de San Luis Potosí, es la incidencia de enfermedades de origen viral.

**Abstract.** Viral infections are one of the most important diseases of chili peppers for drying in north central Mexico. Mixed viral infections are common in chili plants worldwide, however, in San Luis Potosi, Mexico there is no information about curtovirus and begomovirus infecting chili pepper plants; therefore, the aim of this study was to obtain information on the presence of geminivirus infecting chili for drying with a common symptomatology. Ten chili pepper plants (*Capsicum annuum* "Mirasol") with typical yellowing symptoms were collected and analyzed using molecular techniques to detect the presence of begomovirus and curtovirus. As for curtovirus, *Beet mild curly top virus* (BMCTV) was found in all samples analyzed, while as for begomovirus, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) were found in eight and ten of the total samples collected, respectively. It is important to mention that in only two of the ten samples PepGMV was present and it was not related to PHYVV.

Additional Keywords: Yellowing, mixed viral infection, geminivirus, molecular detection.

One of the main problems that affect the chili pepper for drying (*Capsicum annuum* L.) crops in north central Mexico, including the highlands of San Luis Potosi state, is the incidence of viral diseases. From an epidemiological point of view, the phenomenon of mixed infections caused by viruses belonging to the same family is particularly important because it favors genetic recombination, which may contribute to the emergence of variants and strains with increased virulence or, like in the geminivirus case, the formation of new species (Ala-Poikela *et al.*, 2005). For the chili crop abundant information exists about infections caused by two or more begomovirus species or combinations of two or more RNA viruses (Abdalla *et al.*,

Desde un punto de vista epidemiológico el fenómeno de infecciones mixtas, causadas por virus pertenecientes a la misma familia, es de particular importancia ya que favorece la recombinación genética, la cual puede contribuir a la aparición de variantes y cepas con mayor virulencia o, en el caso de Geminivirus, nuevas especies (Ala-Poikela *et al.*, 2005). En el caso del cultivo de chile existe abundante información acerca de infecciones producidas por dos o más especies de begomovirus o combinaciones de dos o más virus de ARN (Abdalla *et al.*, 1991; Méndez-Lozano *et al.*, 2002; Velásquez-Valle *et al.*, 2012a). En el estado de Zacatecas, México, Fraire *et al.* (2011) reportaron la infección mixta de plantas de chile por los virus huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper huasteco yellow vein virus*: PHYVV), del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*: PepGMV) y del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*: CMV). Es notoria la falta de información acerca de infecciones complejas donde intervengan tanto begomovirus como curtovirus, ambos pertenecientes a la familia *Geminiviridae* cuya frecuencia de detección es creciente en México (Velásquez-Valle *et al.*, 2012b; Chen *et al.*, 2011) por lo que el objetivo del presente trabajo consistió en identificar la presencia de begomovirus y curtovirus en plantas de chile para secado que mostraban una sintomatología similar.

A mediados de Junio de 2010 se colectaron muestras de tejido joven de diez plantas de chile para secado tipo Mirasol seleccionadas al azar y que mostraban síntomas conspicuos de la enfermedad denominada amarillamiento del chile (Velásquez-Valle *et al.*, 2011) en una parcela comercial localizada en el altiplano del estado de San Luis Potosí, México.

Para la detección de begomovirus y curtovirus, las muestras se molieron en presencia de nitrógeno líquido en morteros preenfriados a -20 °C. El tejido molido se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL para extraer DNA total de cada muestra, a continuación se agregaron 600 µl de solución amortiguadora de extracción (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 % CTAB (bromuro de hexacetil trimetil amonio) p/v, 1 % de β-mercaptoetanol) agitando la mezcla hasta homogeneizar. Las muestras se incubaron por 20 min a 65 °C con una leve homogenización cada 3 min. Después de la incubación se agregaron 600 µl de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron con agitación por 15 min. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo conteniendo 600 µl de isopropanol frío. A continuación las muestras se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente por 5 min y posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min; se descartó el sobrenadante y los tubos se invirtieron por 5 min para secar el DNA precipitado. Posteriormente el DNA se resuspendió en 100 µl de buffer TE (Tris- EDTA 0.01 mM pH 8.0) y 100 µl de etanol al 100 %. El BMCTV fue detectado por PCR usando los oligonucleótidos BMCTV CP4f (5'-CAG TAT CGA CCA GTT GTT T-3') y BMCTV CP6r (5'-CTC TTC GAA TAC GAT AAG TAG-3') (Creamer *et al.*, 2005), los cuales amplifican una porción del gen que codifica la proteína de la cápside del virus. Para la

1991, Mendez-Lozano *et al.*, 2002, Velásquez-Valle *et al.* 2012a). In Zacatecas state, Mexico, Fraire *et al.* (2011) reported mixed infection of chili pepper plants by pepper huasteco yellow vein viruses (*Pepper huasteco yellow vein virus*: PHYVV), chili golden mosaic (*Pepper golden mosaic virus*: PepGMV) and cucumber mosaic (*Cucumber mosaic virus*: CMV). It is notorious the lack of information about complex infections involving both begomovirus and curtovirus, both belonging to the *Geminiviridae* family whose detection frequency is increasing in Mexico (Velásquez-Valle *et al.*, 2012b, Chen *et al.*, 2011); therefore, the aim of this study was to identify the begomovirus and curtovirus presence in dried chili plants showing similar symptomatology.

During mid-June 2010, tissue samples of ten young chili plants for drying, Mirasol type, were randomly collected mostly of those showing prominent symptoms of the disease known as "Yellowing of chili" (Velásquez-Valle *et al.*, 2011) in a commercial lot located in the highlands of the state of San Luis Potosi, Mexico.

For curtovirus and begomoviruses detection, samples were ground in liquid nitrogen in -20 °C precooled mortars. Grounded tissue was transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes for total DNA extraction for each sample, then 600 µl of extraction buffer were added (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 % CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) w/v, 1% β-mercaptoethanol) and stirred until homogenization. The samples were incubated during 20 min at 65 °C with a slight homogenization every 3 min. After incubation, 600 µl of chloroform-isoamyl alcohol mixture (24:1) were added and mixed during 15 min. The tubes were centrifuged at 13,000 rpm during 15 min and the supernatant was transferred to a new tube containing 600 µl of cold isopropanol. The samples were mixed and left at room temperature during 5 min, then they were centrifuged at 13,000 rpm during 15 min; the supernatant was discarded and the tubes were inverted during 5 minutes to dry the precipitated DNA. Lastly, the DNA was resuspended in 100 µl of TE buffer (0.01 mM Tris-EDTA, pH 8.0) and 100 µl of 100 % ethanol. The BMCTV was detected by PCR using the following oligonucleotides: BMCTV CP4f (5'-CAG TAT CGA CCA GTT GTT T-3') and BMCTV CP6r (5'-CTC TTC GAA TAC GATAAG TAG-3') (Creamer *et al.*, 2005), which are used to amplify a portion of the gene that encodes the protein of the capsid virus. For the reaction, 5-10 ng of the mold and 20 µl of a reaction consisting of 0.250 µM of each primer, 3 units of Taq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 250 µM dNTPs, 2 µl of the buffer for Taq 10X (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 1.1 % gelatin) and 3 mM MgCl<sub>2</sub> were used. PCR reaction consisted of: 35 consistent cycles at 94 °C during 30 sec, 59 °C during 60 sec and 72 °C during 90 sec and a final extension of 72 °C during 5 min. The amplification products were separated on 2 % agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized by ultraviolet light on a SIGMA T1201 instrument. The presence of a 576 bp fragment was considered as a positive detection for BMCTV.

A unique protocol for genomic DNA extraction was,

reacción se utilizaron 5-10 ng del templado y 20 µl de una reacción compuesta por 0,250 µM de cada iniciador, 3 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), 250 µM de dNTPs, 2 µl de la solución amortiguadora para Taq 10X (15 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1 % de gelatina) y 3 mM Cl<sub>2</sub>Mg. La reacción de PCR consistió en: 35 ciclos consistentes de 94 °C por 30 seg, 59 °C por 60 seg y 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron mediante luz ultravioleta en un equipo SIGMA T1201. La presencia de un fragmento de 576 pares de bases se consideró como detección positiva para el BMCTV.

Se adoptó un protocolo de extracción de DNA genómico único basado en una modificación del método de Dellaporta *et al.* (1983) que utiliza nitrógeno líquido y el buffer de extracción "A" compuesto por Tris 100 mM pH8.0, NaCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50mM pH-8.0 y agua destilada. La combinación de oligonucleótidos utilizada para identificar la presencia del genoma A de begomovirus fue pRep-DGR / pCP70-Mot (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002); mientras que para el diagnóstico e identificación completa de curtovirus se utilizó la combinación de iniciadores RepQEW-for/CP450-rev (Velasquez-Valle *et al.*, 2012), la composición de la mezcla de reacción para PCR fue la misma y consistió en lo siguiente: Buffer Taq DNA polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1M, Taq polimerasa 2.5 UT, DNA 1g. Las condiciones para la amplificación del ADN viral fueron: desnaturalización inicial a 94C/2min, y 35 ciclos conformados por una temperatura inicial de 94C/1min, una temperatura de alineamiento de 55C/1 min y una extensión a 72C/1min, con una extensión final de 72C/5 min. Los productos de PCR obtenidos se clonaron directamente en el plásmido PGEM-TEasy (Promega, Madison, WI), según las indicaciones del proveedor. La transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 y la extracción del DNA plasmídico se realizó de acuerdo al procedimiento modificado de Birnboim (Sambrook y Russell, 2001). Los productos clonados fueron secuenciados, y la secuencia nucleotídica obtenida en cada caso se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando los algoritmos Blast N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y ClustalV (MegAlign, DNASTAR Madison, WI).

Las diez muestras analizadas resultaron positivas para la presencia de curtovirus, específicamente BMCTV (Cuadro 1), lo cual concuerda con la sintomatología observada localmente de enanismo, amarillamiento del follaje y ausencia de estructuras reproductivas, entre otros, reportada a nivel mundial para este tipo de infecciones (Creamer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Velásquez-Valle *et al.*, 2011).

PHYVV se detectó en ocho de las diez muestras analizadas mientras que PepGMV fue detectado en todas las muestras analizadas (Cuadro 1). De acuerdo con Brown (2003a) la infección mixta del Pep GMV y PHYVV es una de las más comunes y económicamente importantes en las

it was based on a modification of Dellaporta *et al.* (1983) method which uses liquid nitrogen and extraction buffer "A" consisting of 100 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0 and distilled water. The oligonucleotides combination used to identify the presence of the A genome of begomoviruses was pRep-DGR / pCP70-Mot (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002); while for the diagnosis and complete curtovirus identification the primers combination RepQEW-for/CP450-rev (Velasquez-Valle *et al.*, 2012) was used, the composition of the reaction mixture for PCR was the same and it was consisting of: Taq DNA polymerase 1X buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 2 oligonucleotides 1M, Taq polymerase 2.5 UT, 1g DNA. The conditions for viral DNA amplification were: initial denaturation at 94C/2 min and 35 cycles consisting of an initial temperature of 94C/1 min, an temperature of alignment 55C/1 min, an extension of 72C/1min, and a final extension of 72C/5 min. The obtained PCR products were cloned directly into the pGEM-TEasy (Promega, Madison, WI) plasmid according to the supplier's directions. The transformation of competent cells of *Escherichia coli* Top 10 and the extraction of the plasmidic DNA was performed according to modified Birnboim method (Sambrook and Russell, 2001). Cloned products were sequenced, and the nucleotide sequence obtained in each case was compared with the available sequences of the GenBank database by using the BLAST N algorithms (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and Clusta IV (MegAlign, DNASTAR Madison, WI).

The ten tested samples were positive for curtovirus presence, specifically BMCTV (Table 1), which is consistent with the dwarfism symptomatology locally observed, foliage yellowing and absence of reproductive structures, among others, reported worldwide for this type

Cuadro 1. Detección de diferentes virus en plantas de chile para secado tipo Mirasol con síntomas de "amarillamiento del chile" en el altiplano de San Luis Potosí, México.

Table 1. Detection of different viruses in chili pepper plants for drying, Mirasol type, with "yellowing of chili" symptoms in highlands of San Luis Potosi, Mexico.

Muestra	Curtovirus BMCTV <sup>x</sup>	Begomovirus	
		PHYVV <sup>y</sup>	PepGMV <sup>z</sup>
1	Positivo	Negativo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Negativo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo	Positivo

<sup>x</sup> *Beet mild curly top virus.*

<sup>y</sup> *Pepper huasteco yellow vein virus.*

<sup>z</sup> *Pepper golden mosaic virus.*

parcelas de chile localizadas en los estados fronterizos de México y Estados Unidos de América. La sintomatología causada por la infección de estos virus incluye mosaico amarillo brillante, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, abultamientos o ampollamientos foliares, enanismo, caída de flor, reducción del tamaño o ausencia de frutos (Fraire, 2010), sin embargo también se ha reconocido que la expresión de síntomas puede variar en función de la variedad de chile, condiciones ambientales, cepas o variantes de begomovirus (Khan *et al.*, 2007), por lo que la sintomatología en las enfermedades virales es frecuentemente poco confiable como método de diagnóstico. No obstante lo anterior, se ha reconocido que uno de los síntomas más evidentes de la infección por PepGMV y PHYVV es el mosaico brillante que suelen tomar las hojas y venas de las plantas enfermas, respectivamente (Brown, 2003a; Brown, 2003b) ninguno de los cuales se manifestó en las plantas de chile Mirasol analizadas en el presente trabajo. En las condiciones del Norte Centro de México, la mayoría de las plantas de chile infectadas por BMCTV mueren antes de completar el ciclo de cultivo por lo que es posible que los síntomas más evidentes de enfermedad causadas por ambos begomovirus no alcanzarían a manifestarse en el follaje más joven de las plantas. Es necesario investigar si la co-infección reportada durante este trabajo ocurre simultáneamente como en el caso de PHYVV y PepGMV (Medina-Ramos *et al.*, 2008) o si un patógeno específico al infectar inicialmente una planta es capaz de enmascarar los síntomas causados por otros virus ya que una de las características más importantes desde el punto de vista fitopatológico es que las infecciones mixtas pueden alterar la severidad de los síntomas pues es bien sabido que en plantas de chile infectadas con PepGMV son mucho más agresivos que los observados en plantas infectadas solo con PHYVV pero cuando ambos virus infectan una misma planta de chile se observa antagonismo que reduce los síntomas producidos por PepGMV favoreciendo la interacción con el insecto vector y su diseminación a otras plantas (Méndez-Lozano *et al.*, 2002). Con base en lo anterior es necesario establecer metodologías que permitan evaluar y caracterizar infecciones mixtas como las que se reportan en este trabajo de tal forma que se pueda confirmar si la infección causada por BMCTV en plantas de chile interfiere con la aparición de los síntomas provocados por PHYVV y PepGMV o si dependiendo de la planta hospedera se pudieran producir un incremento en la severidad de los síntomas como consecuencia de la infección causada por BMCTV, PHYVV y PepGMV.

Las muestras analizadas provenían de plantas de chile que mostraban síntomas de la enfermedad denominada amarillamiento entre los que destacan: enanismo, follaje clorótico o amarillo en la planta completa, ausencia total o parcial de estructuras reproductivas (botones, flores o frutos), hojas alargadas y de consistencia gruesa, así como frutos pequeños y deformes; esta sintomatología ya había sido previamente asociada con la presencia del *Beet mild curly top virus* (BMCTV) en el área productora de esta hortaliza en el vecino estado de Zacatecas (Velásquez-Valle *et al.*, 2008, Velásquez-Valle *et al.*, 2011); las zonas

of infections (Creamer *et al.*, 2003 Chen *et al.* 2011; Velásquez-Valle *et al.*, 2011).

PHYVV was detected in eight of the ten samples analyzed, while PepGMV was detected in all samples analyzed (Table 1). According to Brown (2003a) the Pep GMV and PHYVV mixed infection is one of the most common and economically important in chili pepper plots located in the border states of Mexico and the United States of America. The symptoms caused by infection with these viruses includes bright yellow mosaic, chlorotic mottle, marginal leaf chlorosis, leaf rolling, swelling or blistering leaf, stunting, flower drop, reduced fruit size or absence (Fraire, 2010), however it has also been recognized that the expression of symptoms may vary depending on the variety of chili, environmental conditions, strains or begomovirus variants (Khan *et al.*, 2007), so the symptoms in viral diseases is often unreliable as a diagnostic method. Nevertheless, it is recognized that one of the most obvious symptoms of PepGMV and PHYVV infection, is the bright mosaic that often show the leaves and veins of infected plants, respectively (Brown, 2003a; Brown, 2003b), none of which was manifested in Mirasol chili pepper plants analyzed in this work. Under the north central Mexico conditions, the majority of infected pepper plants by BMCTV die before completing the crop cycle, so it is possible that the most obvious symptoms of illness caused by both begomovirus are not shown in the youngest foliage of the plants. It is necessary to investigate whether co-infection reported during this study occurs simultaneously as in the case of PHYVV and PepGMV (Medina-Ramos *et al.*, 2008) or if a specific pathogen, when initially infecting a plant, is able to mask the symptoms caused by other viruses, since one of the most important characteristics from the phytopathological point of view is that mixed infections may alter the severity of the symptoms; it is well known that in chili pepper plants infected with PepGMV the symptoms are much more aggressive than those observed in plants infected with PHYVV, but when both viruses infect the same chili pepper plant antagonism is observed which reduces the symptoms caused by PepGMV encouraging interaction with the vector insect and its spreading to other plants (Mendez-Lozano *et al.*, 2002). Based on the above, it is necessary to establish methodologies to evaluate and characterize mixed infections such as those reported in this work, so that it is possible to confirm whether the infection caused by BMCTV in chili plants interferes with the emergence of the symptoms caused by PHYVV and PepGMV, or if depending on the host plant it could be possible to produce an increase in the severity of symptoms as a consequence of the infection caused by BMCTV, PHYVV and PepGMV.

The samples analyzed were from chili pepper plants showing symptoms of the disease known as "yellowing of chili", among them: dwarfism, chlorotic or yellow foliage in the whole plant, total or partial absence of reproductive structures (buds, flowers or fruits), elongated and thick leaves and small and misshapen fruit; these symptoms had been previously associated with the presence of the *Beet mild curly top virus* (BMCTV) in a vegetable producing area of Zacatecas state (Velásquez-Valle *et al.*, 2008,

productoras de chile para secado de ambos estados no se encuentran físicamente separadas sino que pertenecen a una misma región geográfica perteneciente al norte centro de México. Los reportes sobre la presencia de al menos tres variantes de BMCTV produciendo infecciones simples en cultivos de chile presentes en el Altiplano Potosino (Comunicación Personal Dr. Gerardo Argüello Astorga) por lo que parece probable que esta sintomatología sea producida por un mismo agente (s) causal (es) para ambos estados.

La información con la que se cuenta sobre la presencia de los vectores de estos virus en la región es parcial: la presencia del vector de begomovirus, la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) no ha sido confirmada en la zona productora de chile en el Altiplano Potosino y es probable que esto se deba en gran parte a las bajas temperaturas y al clima semiárido característicos de la región lo cual conlleva a la presencia de bajas poblaciones de este insecto. Con respecto al vector del BMCTV, la chicharrita *Circulifer tenellus* Baker, existen reportes que indican que se distribuye ampliamente en el norte centro del país, incluyendo el área productora de chile para secado del Altiplano Potosino (Velásquez-Valle *et al.*, 2008) ya que el clima semiárido favorece su reproducción y diseminación (Bennett, 1971). Durante este trabajo se logró detectar por primera vez la presencia de dos geminivirus pertenecientes al género de los begomovirus (PepGMV y PHYVV) y uno perteneciente al género de los curtovirus (BMCTV) infectando plantas de chile para secado en México. Es necesario llevar a cabo estudios que confirmen si los síntomas causados por BMCTV son capaces de atenuar a los producidos por PepGMV y PHYVV o si eventualmente y dependiendo del hospedero la presencia de estos tres virus puede producir nuevas sintomatologías cada vez más agresivas.

#### LITERATURA CITADA

- Abdalla OA, Desjardins PR, and Dodds JA. 1991. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting peppers in California. *Plant Disease* 75:1019-1023.
- Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JPT, and Kvarnheden A. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54:448-459.
- Ascencio-Ibáñez JT, Argüello-Astorga GR, Méndez-Lozano J. and Rivera-Bustamante RF. 2002. First report of Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Disease* 86:692.
- Bennett CW. 1971. The curly top disease of sugarbeet and other plants, Monograph 7. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Brown JK. 2003a. Pepper golden mosaic virus. Pp. 31-32. *In: Pernezny K, Roberts PD, Murphy JF, and Goldberg NP (Eds.). Compendium of pepper diseases. The APS Press. USA. 63 p.*
- Brown JK. 2003b. Pepper huasteco yellow vein virus. Pp. 32-33. *In: Pernezny K, Roberts PD, Murphy JF, and Velásquez-Valle et al., 2011); chili pepper for drying producing areas of both states are not physically separated but belong to the same geographical region in the north central Mexico. There are reports of the presence of at least three variants of BMCTV producing simple infections in chili crops at the Altiplano Potosino (Personal Communication Dr. Gerardo Argüello Astorga) so, it might be possible that these symptoms are caused by the same causal agent(s) in both states.*
- Current information about the presence of these virus vectors in the region is partial: the presence of begomovirus vector, the whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) has not been identified in the chili pepper producing area at the Altiplano Potosino, and it is probable that this might be due to the low temperatures and to the semiarid climate typical of the region which leads to the presence of low populations of this insect. Regarding the BMCTV vector, the leafhopper *Circulifer tenellus* Baker, there are reports that this insect is widely distributed in the north central Mexico, including the chili for drying producing area in the Altiplano Potosino (Velásquez-Valle *et al.*, 2008) because the semiarid climate encourages its reproduction and dissemination (Bennett, 1971). During this work it was detected for the first time, the presence of two geminiviruses belonging to the begomovirus gender (PepGMV and PHYVV) and one belonging to the curtovirus genus (BMCTV) infecting chili for drying plants in Mexico. More studies are necessary to confirm whether the symptoms caused by BMCTV are able to mitigate those produced by PepGMV and PHYVV, or if eventually and depending on the host, the presence of these three viruses can produce new symptomatology increasingly aggressive.
- 
- Goldberg NP (Eds.). Compendium of pepper diseases. The APS Press. USA. 63 p.
- Chen L-F, Vivoda E, and Gilbertson RL. 2011. Genetic diversity in curtoviruses: a highly divergent strain of *Beet mild curly top virus* associated with an outbreak of curly top disease in pepper in Mexico. *Archives of Virology* 156:547-555.
- Creamer R, Carpenter J, and Rascon J. 2003. Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico chile. *Southwestern Entomologist* 28:177-182.
- Creamer R, Hubble H, and Lewis A. 2005. Curtovirus infection of chile pepper in New Mexico. *Plant Disease*. 89:480-486.
- Dellaporta S., Wood J., and Hicks J. 1983. A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20.
- Fraire VS. 2010. Zacatecas. Universidad Autónoma de Zacatecas. Folleto para Productores Agrícolas. Zacatecas, México. 6 p.
- Fraire S, Recendez-Alvarado M, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante R, and Alvarado-Rodríguez M. 2011. Geminiviral (PHYVV and PepGMV) and cucumoviral (CMV) co-infection in chili pepper fields: The AC1 gene in PepGMV with a mutation with aminoacid change.

- Phytopathology 101:S54.
- Khan AJ, Al-Saady NA, Al-Mahraki MS, Al-Oufi M, Al-Subhi AM. 2007. Molecular characterization of *Begomovirus* infecting sweet pepper in Oman. *Indian Journal of Biotechnology* 6:45-51.
- Medina-Ramos G, De la Torre-Almaraz R, Bujanos-Muñiz R, Guevara-González RG, Tierranegra-García N, Guevara-Olvera L, González-Chavira MM, and Torres-Pacheco I. 2008. Co-Transmission of *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* in chili pepper by *Bemisia tabaci* (Genn.). *Journal of Entomology* 5:176-184.
- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, and Rivera-Bustamante RF. 2002. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93:270-277.
- Sambrook J, and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA. 1112-1118 pp.
- Velásquez-Valle R, Medina-Aguilar MM, and Creamer R. 2008. First report of *Beet mild curly top virus* infection of chile pepper in North-Central Mexico. *Plant Disease* 92:650.
- Velásquez-Valle R, Mena-Covarrubias J y Reveles-Torres LR. 2011. Amarillamientos del chile para secado en el norte-centro de México. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 35. Calera de V. R., Zac., México. 40 p.
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Mena-Covarrubias J. 2012a. Incidencia y sintomatología de cinco virus en parcelas comerciales de chile seco en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:381-390.
- Velásquez-Valle R, Mena-Covarrubias J, Reveles-Torres LR, Argüello-Astorga GR, Salas-Luévano MA, and Mauricio-Castillo JA. 2012b. First report of *Beet mild curly top virus* in dry bean in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 96:771.



# Localización *In Situ* de Inclusiones del Virus Tristeza de los Cítricos con Anticuerpos Desarrollados Contra la Proteína Recombinante no Estructural p20

## *In Situ* Localization of *Citrus tristeza virus* Inclusion Bodies with Antibodies Developed to the Recombinant p20 Non-Structural Protein

María Magdalena Iracheta Cárdenas, Sanjuanita Lyzzeth Salazar Martínez, Instituto de Biotecnología, Ave. Universidad s/n. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450, México; María Luisa Cárdenas Ávila, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Botánica Apartado Postal 128-F. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450 México y Mario A. Rocha Peña, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Laboratorio de Virología Vegetal. Apartado Postal 128-F. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP 66450 México. Correspondencia: mario.rochape@uanl.edu.mx.

(Recibido: Junio 29, 2012 Aceptado: Agosto 23, 2012)

Iracheta Cárdenas, M. M., Salazar Martínez, S. J., Cárdenas Ávila, M. L. y Rocha Peña, M. A. 2012. Localización *In Situ* de Inclusiones del Virus Tristeza de los Cítricos con Anticuerpos Desarrollados Contra la Proteína Recombinante no Estructural p20. Revista Mexicana de Fitopatología 30:161-166.

**Resumen.** Se describe el desarrollo de un inmunoensayo para la localización *in situ* de inclusiones virales inducidas por el virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) mediante microscopía de luz con anticuerpos preparados contra la proteína recombinante p20 no estructural del CTV. Se emplearon cortes manuales de aproximadamente 100 µm de grosor a partir de corteza de varetas de plantas de cítricos sanas e infectadas por el CTV. Los cortes se fijaron en 70 % de etanol y se incubaron subsecuentemente con anticuerpos anti-p20 desarrollados ya sea en rata o conejo en diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 y 1:1,000 y 1:3,000 respectivamente, y con conjugados comerciales IgG anti-especie en diluciones de 1:30,000 para cada uno de ellos, agregando al final la solución cromogénica compuesta por NBT/BCIP. Las inclusiones virales se visualizaron en un microscopio de luz a 10 y 40 aumentos en forma de áreas irregulares con coloración azul oscura en el área del floema y fibras del floema en cortes efectuados con plantas infectadas por el CTV; los tejidos provenientes de plantas sanas no presentaron ningún tipo de coloración, lo que permitió discriminar plantas sanas e infectadas por el CTV.

Palabras clave adicionales: DIBA, serología, proteína recombinante, microscopía de luz.

**Abstract:** An *in situ* immunoassay is described for localization of *Citrus tristeza virus* (CTV) inclusion bodies by light microscopy with antibodies developed to the recombinant p20 non-structural protein. Free hand bark sections of ca. 100 µm thick from healthy or CTV infected plants were fixed with 70 % ethanol and subsequently incubated with specific polyclonal antiserum anti-p20 either from rat or rabbit at dilutions 1:5,000 y 1:10,000 y 1:1,000 and 1:3,000 respectively and IgG anti species at 1:30,000 dilution; at the end, the chromogenic solution NBT/BCIP was added. Viral inclusion bodies were visualized by light microscopy at 10 and 40X magnifications as dark blue irregular areas in phloem associated tissues in CTV infected plants; no dark blue color was observed in the phloem tissues of healthy plants.

Additional keywords: DIBA, serology, recombinant protein, light microscopy.

*Citrus tristeza virus* (CTV, genus *Closterovirus*, family *Closteroviridae*) consists of long flexuous particles of 2000 x 12 nm and it is phloem restricted in citrus infected plants (Bar-Joseph and Lee, 1989). The virus induces characteristic amorphous inclusion bodies in the cytoplasm of phloem associated cells in diverse citrus hosts infected with different CTV isolates with diverse biological properties (Bar-Joseph and Lee, 1989; Brlansky and Lee, 1990; Miao and Skaria, 2002; Schneider, 1959). Genomic RNA (gRNA) of CTV consists of 12 open reading frames which encodes at least 12 proteinaceous products (Karasev *et al.*, 1995); the presence of CTV inclusion bodies has been associated to the accumulation of a non structural protein of a molecular mass of ca. of 20kDa, expressed by the p20 gene

El virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV, género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*) consiste de partículas largas y flexibles de 2000 x 12 nm de tamaño y se restringe al floema de plantas infectadas (Bar-Joseph y Lee, 1989). El virus induce la formación de inclusiones amorfas características en el citoplasma de células asociadas al floema en diversos hospedantes cítricos infectados con diferentes aislamientos del virus con propiedades biológicas diversas (Bar-Joseph y Lee, 1989; Bransky y Lee, 1990; Miao y Skaria, 2002; Schneider, 1959). El RNA genómico del CTV (RNAg) consiste de 12 marcos de lectura abierta los cuales codifican para por lo menos 12 productos de naturaleza proteica (Karasev *et al.*, 1995); la presencia de inclusiones virales del CTV se ha asociado a la acumulación de una proteína no estructural con una masa molecular de aproximadamente 20kDa, producida por el gen *p20* situado en la porción proximal 3' del genoma del virus (Gowda *et al.*, 2000). El presente estudio reporta el uso de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p20 no estructural del CTV para la localización *in situ* de inclusiones virales empleando microscopía de luz.

Se emplearon muestras de árboles de toronjo (*Citrus paradisi* Macf.) con antecedentes de infección positiva al CTV procedentes de la huerta Los Castores en el municipio de General Terán, Nuevo León. Como testigos negativos se emplearon árboles sanos de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limón (*Citrus limon* L.) y tangor Murcott (mandarino x naranjo) del Lote de Variedades del Campo Experimental General Terán, del INIFAP. Las muestras estuvieron compuestas por seis a ocho brotes recién expandidos, colectados alrededor de la copa de los árboles, a una altura aproximada de 1.50 m sobre el nivel del suelo. Todas las muestras se analizaron mediante inmunoadherencia a membranas de nitrocelulosa (DIBA = dot-immunobinding assay) (Rocha-Peña *et al.*, 1991) con anticuerpos policlonales desarrollados para la proteína recombinante p25 de la cápside (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) para verificar su estado con respecto a la infección por CTV. Las muestras positivas al CTV fueron las de los árboles de toronja con clave A2, A7, A12, A27, A110 y A111; mientras que las muestras de toronja A1, A6, A10, A11, A15 naranja F3A2, F4A1, F4A2, limón F5A3, F7A1 y el tangor Murcott dieron resultados negativos de infección por el CTV (Cuadro 1).

Para la localización de inclusiones virales se emplearon anticuerpos anti-p20 desarrollados en conejo raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* L.) (clave 201) y en ratas albinas (*Rattus norvegicus* Berkenhout). Los anticuerpos anti-p20 se prepararon en ambas especies de mamíferos según lo descrito por Iracheta-Cárdenas *et al.* (2008) para la proteína recombinante p25 del CTV y se emplearon en forma de antisuero crudo diluido de 1:1,000 hasta 1:10,000 en solución de TBST-PVP (= TBS 1X, + Tween 0.05 % + PVP 2 %). Los ensayos de inmunoensayo *in situ* se efectuaron en cortes manuales de alrededor 100 µm de grosor de corteza de varetas de cada una de las muestras de cítricos positivas y negativas al CTV. Se emplearon de 3 a 5 varetas de cada una de las muestras de cítricos y se

located at the 3' end of the virus genome (Gowda *et al.*, 2000). The current work reports the use of antibodies developed to the recombinant p20 non structural protein for the *in situ* localization of viral inclusion bodies by light microscopy.

CTV infected grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) samples were from the citrus grove "Los Castores" located at the municipality of General Teran, Nuevo Leon. Healthy sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), lemon (*Citrus limon* L.) and tangor Murcott (mandarin x sweet orange) used as negative controls were from the Citrus Variety Block from the INIFAP General Teran Experiment Station. The samples consisted of six to eight fully expanded shoots taken around the canopy at a 1:50 m height from the ground. All samples were analyzed by dot-immunobinding assay (DIBA) (Rocha-Peña *et al.*, 1991) with polyclonal antibodies developed to the recombinant p25 capsid protein (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008) to verify their status with respect of CTV infection. CTV infected samples were those grapefruit trees labeled with field code A2, A7, A12, A27, A110 and A111; whereas, samples of grapefruit A1, A6, A10, A11, A15, sweet orange F3A2, F4A1, F4A2, lemon F5A3, F7A1 and tangor Murcott provided negative results for CTV infections (Table 1).

For CTV inclusion bodies *in situ* localization, anti-p20 antibodies developed in New Zealand rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) (code 201) and white rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout) were used. Anti-p20 antibodies in both mammalian species were prepared as described by Iracheta-Cárdenas *et al.* (2008) to the recombinant p25 protein of CTV, and used as crude antisera diluted at 1:1,000 to 1:10,000 in TBST-PVP (= TBS 1X, + Tween 0.05 % + PVP 2 %). *In situ* immunoassays were conducted on bark tissue of free-hand cross sections of ca. 100 µm thin of each CTV positive and healthy controls citrus samples. Three to five budsticks of each citrus samples were used and five cross sections of each budstick, to give a total of 25 to 50 cross sections by sample. The cross sections were immersed in 5mL 70 % ethanol for five min with continuous stirring at 25 °C. The ethanol was removed and the samples were individually incubated with 5 mL of the anti-p20 corresponding antibodies {rat (code R2) or rabbit (201)} diluted in TBST-PVP buffer}; the tissue samples were rinsed in 5 mL of TBST-PVP during five to ten min. Afterwards, the tissue samples were incubated with 5 mL of IgG anti-rat IgG -AP (Sigma A8438) or IgG anti-rabbit IgG -AP (Sigma A3812), at 25 °C. The tissue samples were rinsed once with 5 mL of TBST-PVP and twice with TBS - Tween 0.05 %, during five to ten min. At the end, the chromogenic substrate NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate) (Sigma B3804) was added during two h to visualize the sites of the p20 protein accumulation. The cross sections were observed by using a Leica DME light microscope at 10X and 40X magnifications. As a general procedure, all the tissue samples were incubated with the corresponding anti-p20 antibodies (rat R2 and rabbit 201) for 14-18 h at 5-10 °C, at different antibody concentrations. The incubation with the

realizaron cinco cortes de cada vareta, para tener un total de entre 25 a 50 cortes por muestra. Los cortes se sumergieron en 5 mL de etanol al 70 % por cinco minutos, en agitación a 25 °C. Se retiró el etanol y se incubaron por separado con 5 mL de los anticuerpos anti-p20 respectivos {rata (clave R2) o conejo (201)} diluidos en solución amortiguadora TBST-PVP; se lavaron con 5 mL de solución TBST-PVP de cinco a diez minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con 5 mL de IgG anti-IgG de rata-AP (Sigma A8438) o IgG anti-IgG de conejo-AP (Sigma A3812), según fuera el caso, a 25 °C. Se lavaron en agitación con 5 mL de solución TBST-PVP y dos veces con TBS -Tween 0.05 %, por cinco a diez minutos. Finalmente, se adicionó como sustrato y cromógeno NBT (azul de nitro tetrazolio) y BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo) (Sigma B3804) por un período de dos horas para visualizar los sitios de acumulación de la proteína p20. Los cortes se observaron en un microscopio de luz Leica DME bajo aumentos de 10X y 40X. Por procedimiento general, las muestras de tejidos se dejaron incubando con los anticuerpos anti-p20 respectivos (rata R2 y conejo 201) por 14-18 h en refrigeración (5-10 °C) a diferentes concentraciones de los mismos. La incubación con los conjugados enzimáticos IgG anti rata y IgG anti conejo fue de 2 h a temperatura de laboratorio.

En términos generales, se encontró consistentemente la presencia de un precipitado azul oscuro en tejidos asociados a floema en los cortes efectuados con todas las muestras positivas al CTV con los anticuerpos anti-p20 tanto de rata R2, como de conejo 201. Los anticuerpos de rata R2 anti-p20, fueron efectivos para la observación de inclusiones virales en diluciones de 1:5,000 y 1:10,000 de antisuero crudo (Figuras 1 A y B). De igual forma, se observó la presencia de precipitado azul oscuro en tejidos asociados a floema con los anticuerpos de conejo (201) anti-p20 en diluciones de 1:1,000 (Figuras 1C y D) y de 1:3,000, con un número reducido de muestras positivas al CTV (datos no mostrados). Las muestras de cítricos sanos empleadas como testigos negativos (Cuadro 1), sometidas a inmunoensayo *in situ* con anticuerpos anti-p20 de rata R2 (Figura 1E) y de conejo 201 (Figura 1F), no presentaron ningún tipo de precipitado de color azul oscuro en ninguno de los tejidos analizados de naranjo dulce, limón, ni tangor Murcott.

enzyme conjugates IgG anti- rat and IgG anti- rabbit was by 2 h at room temperature.

Overall, the presence of a dark blue precipitate was consistently found in phloem associated tissues in all cross sections assayed with all CTV infected samples with either rat R2 or rabbit 201 anti-p20 antibodies. Anti-p20 rat R2 antibodies were effective to the inclusion bodies visualization at 1:5,000 and 1:10,000 dilution of crude antiserum (Figures 1 A y B). Likewise, comparative results of the presence of a dark blue precipitate in phloem associated tissues were obtained with rabbit (201) anti-p20 antibodies at 1:1,000 dilution (Figures 1C y D) and at 1:3,000 dilution with a limited number of CTV infected samples (not shown). The healthy citrus samples used as negative controls (Table 1), subjected to the *in situ* immunoassay with anti-p20 rat R2 (Figure 1E) and rabbit 201 (Figure 1F) antibodies, did not show the dark blue precipitate in all analyzed samples of sweet orange, lemon, or Murcott tangor.

According to the results, the presence of the dark blue precipitate was placed only in the phloem associated tissues of CTV infected plants, showing the reactivity of the anti-p20 antibodies with the p20 non structural protein of CTV. The inclusion bodies observed in this study in the phloem tissue by using the anti-p20 antibodies not only show a similarity with those reported for CTV either with the Azure A stain (Bar-Joseph and Lee, 1989; Brlansky and Lee, 1990; Miao and Skaria, 2002), and with anti-CTV monoclonal antibodies reported by Lin *et al.* (2000), but they have similarity with those inclusion bodies formed by other virus members of the *Closteroviridae* family, such as beet yellows virus (BYV) (Esau *et al.*, 1967), grapevine leaf roll virus (Faoro *et al.*, 1991), lettuce infectious yellow virus (LIYV) (Medina *et al.*, 1998), tomato infectious chlorosis (TICV) (Wisler *et al.*, 1996) and tomato chlorosis (ToCV) (Wisler *et al.*, 1998) viruses.

According to the literature, there are only two published reports where there have been used antibodies for detection of the p20 no structural protein of CTV: the original work by Gowda *et al.* (2000) in which it was determined the function and expression of the p20 protein in citrus CTV infected tissue, and the work by Ecale-Zhou *et al.* (2002) which was a study at ultrastructural level and

Cuadro 1. Muestras de cítricos empleados para la localización *in situ* de inclusiones por el CTV.

Table 1. Citrus samples used for *in situ* localization of CTV inclusion bodies.

Clave	Especie	DIBA <sup>2</sup>	Clave	Especie	DIBA <sup>3</sup>	Clave	Especie	DIBA <sup>3</sup>
A 1	Toronja <sup>1</sup>	-	A 12	Toronja <sup>1</sup>	+	F4A1	Naranja <sup>2</sup>	-
A 2	Toronja <sup>1</sup>	+	A 15	Toronja <sup>1</sup>	-	F4A2	Naranja <sup>2</sup>	-
A 6	Toronja <sup>1</sup>	-	A 27	Toronja <sup>1</sup>	+	F5A3	Limón <sup>2</sup>	-
A 7	Toronja <sup>1</sup>	+	A 110	Toronja <sup>1</sup>	+	F7A1	Limón <sup>2</sup>	-
A 10	Toronja <sup>1</sup>	-	A 111	Toronja <sup>1</sup>	+	Murcott	Tangor	-
A 11	Toronja <sup>1</sup>	-	F 3A2	Naranja <sup>2</sup>	-			

<sup>1</sup>Huerta Los Catores, General Terán, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Lote de variedades Campo Experimental del INIFAP, General Terán, Nuevo León, México.

<sup>3</sup>Reacción positiva (+) o negativa (-) en pruebas DIBA.

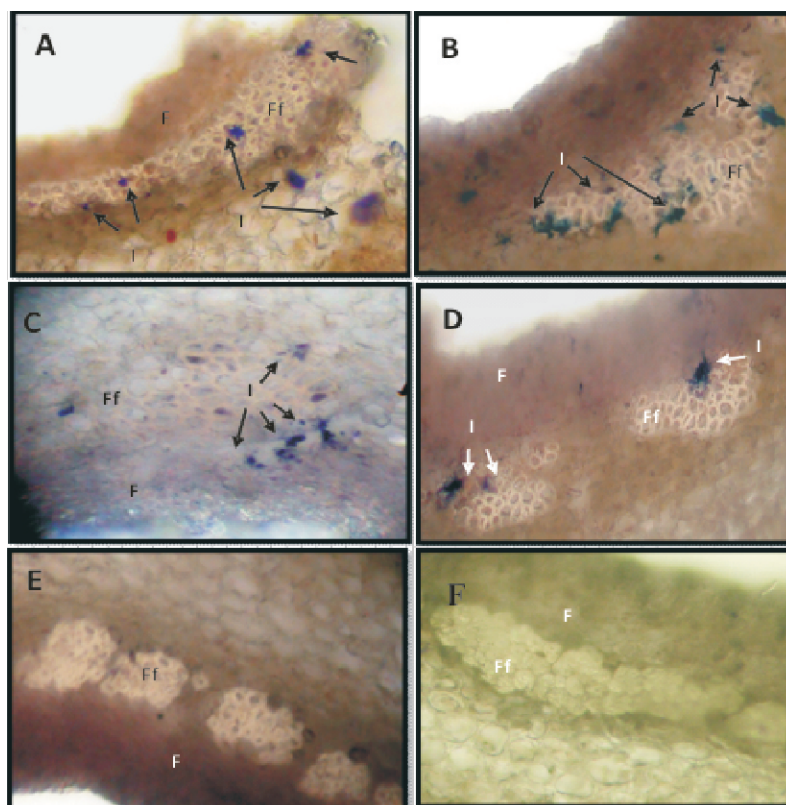


Figura 1. Inmunoensayo *in situ* con anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p20 del virus de la tristeza (CTV) en cortes transversales de corteza de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. **A y B**, uso de anticuerpos anti-p20 de rata R2 a diluciones 1:5,000 y 1:10,000 con muestras de toronja A7 y A110 positivas al CTV, respectivamente. **C y D**, uso de anticuerpos anti-p20 de conejo 201 en dilución 1:1,000 con muestras de toronja A7 y A110 positivas al CTV, respectivamente. **E y F**, cortes de cítricos sanos de naranja F3A2 y toronja A11 (CTV negativos), analizadas con anticuerpos anti-p20 de rata R2 (1:5,000) y conejo 201 (1:1,000), respectivamente. F = floema; Ff = fibras del floema; I = inclusiones (señaladas con flechas).

Figure 1. *In situ* immunoassay with antibodies developed to the recombinant CTV p20 protein in cross sections of bark of healthy and CTV infected citrus samples. **A and B**, rat R2 anti-p20 antibodies at 1:5,000 and 1:10,000 dilutions with A110 CTV positive A7 and A110 grapefruit samples, respectively. **C and D**, rabbit 201 anti-p20 antibodies at 1:1,000 dilution with A110 CTV positive A7 and A110 grapefruit samples, respectively. **E and F**, cross sections of healthy sweet orange F3A2 and grapefruit A11 (CTV negative), analyzed with rat R2 anti-p20 (1:5,000) and rabbit 201 (1:1,000), respectively. F = phloem; Ff = phloem fibers; I = inclusions (pointed by arrows).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la formación del precipitado azul oscuro del cromógeno se ubicó en forma particular en los tejidos asociados al floema en plantas infectadas por el CTV; lo anterior demostró la reactividad de los anticuerpos anti-p20 con la proteína p20 no estructural del CTV. Los cuerpos de inclusión observados en el floema mediante los anticuerpos anti-p20 en el presente estudio, no solo presentan gran similitud con los reportados para este virus tanto con las tinciones con Azure A (Bar-Joseph y Lee, 1989; Brlansky y Lee, 1990; Miao y Skaria, 2002), y con anticuerpos monoclonales anti-CTV reportados por Lin *et al.* (2000), sino que también lo tienen con los cuerpos de inclusión formados por otros miembros de la familia *Closteroviridae*, como es el caso de los virus del amarillamiento de la remolacha (BYV) (Esau *et al.*, 1967), del enrollamiento de la hoja de vid (Faoro *et al.*, 1991),

cytopathology on sweet orange (*C. sinensis*) and mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]; in both studies gold labeled antibodies were used and the detection was carried out by transmission electron microscopy. According to our knowledge, this is the first work where antibodies developed to the recombinant p20 protein are used to discriminate CTV infected from healthy citrus tissue; likewise, the study involved the combination of antibodies labeled with alkaline phosphatase and a chromogenic solution that precipitates on the sites of accumulation of the p20 protein present in the inclusion bodies, which can be relatively easily visualized by light microscopy. The use of gold labeled antibodies reported by Gowda *et al.* (2000) and Ecale-Zhou *et al.* (2002) has as a main inconvenience the need of transmission electron microscopy.

amarillamiento infeccioso de la lechuga (LIYV) (Medina *et al.*, 1998), clorosis infecciosa (TICV) (Wisler *et al.*, 1996) y clorosis del tomate (ToCV) (Wisler *et al.*, 1998).

De acuerdo a la literatura, solo existen dos trabajos en donde se han empleado anticuerpos para la detección de la proteína p20 no estructural del CTV: el trabajo original de Gowda *et al.* (2000) en donde se determinó la función y expresión de la proteína p20 en tejido infectado de cítricos y el trabajo de Ecalle-Zhou *et al.* (2002) que consistió en un estudio a nivel de ultra estructura y citopatología en naranjo (*C. sinensis*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle); en ambos estudios se emplearon anticuerpos conjugados con oro y la detección se llevó a cabo mediante microscopía electrónica. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en que se emplean anticuerpos desarrollados contra la proteína p20 recombinante del CTV para la discriminación de plantas sanas e infectadas por el CTV; asimismo, el estudio comprendió el modelo con una combinación de anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina y una solución cromogénica que precipita en los sitios de acumulación de la proteína p20 presente en las inclusiones virales, las cuales se pueden visualizar con facilidad a nivel de microscopía de luz. El empleo de anticuerpos marcados con oro reportado en los trabajos de Gowda *et al.* (2000) y Ecalle-Zhou *et al.* (2002) tiene como inconveniente la necesidad de recurrir a la microscopía electrónica.

La opción de emplear anticuerpos dirigidos contra la proteína p20 no estructural del CTV con fines de detección, se puede sustentar en los reportes que existen sobre la abundancia en que se producen los RNAs subgenómicos relacionados con el gen p20 y a la relativamente alta concentración de la proteína p20 en el hospedero (Gowda *et al.*, 2000), lo cual podría asegurar la presencia de las inclusiones virales para su detección. Los reportes de la presencia consistente de inclusiones virales en plantas infectadas por el CTV (Brlansky y Lee, 1990) apoyan esta aseveración. No obstante lo anterior, el uso del inmunoensayo *in situ* con anticuerpos anti-p20 no sustituye otros métodos para la detección serológica del CTV como son la técnica ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979) o la inmunopresión (Garnsey *et al.*, 1993).

## CONCLUSIONES

Partiendo de los resultados obtenidos en el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

Los anticuerpos anti-p20 de rata R2 y de conejo 201 reconocieron a la proteína no estructural p20 en su forma nativa mediante inmunoensayo *in situ* en cortes de corteza de plantas de cítricos infectados por el CTV. Con los anticuerpos anti-p20 de rata R2 y de conejo 201 se discriminó tejido infectado por el CTV, de tejido de plantas sanas.

**Agradecimientos.** La presente investigación tuvo financiamiento del CONACYT-México, Proyecto 83427 CB 2007-1. Los autores agradecen al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nuevo León, con sede en Montemorelos, N.L., por permitir el acceso y toma de

The alternative of using antibodies developed to the p20 non structural protein for CTV detection, relies on the reports on the abundance by which p20 gene related subgenomic RNAs are produced, as well as the relatively high concentration of the p20 protein in the citrus host (Gowda *et al.*, 2000), which could assure the presence of the inclusion bodies for their detection. The reports of the consistent presence of inclusion bodies in CTV infected plants (Brlansky y Lee, 1990) support this conclusion. Nevertheless, the use of the *in situ* immunossay with anti-p20 antibodies do not substitutes other serological CTV detection methods such as either ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979) or direct tissue blot immunoassay (Garnsey *et al.*, 1993).

## CONCLUSIONS

In the light of the results obtained in this work, the following conclusions were established:

Both the rat R2 and rabbit 201 anti-p20 antibodies detected the non structural p20 protein in its native form by *in situ* immunoassay in thin cross sections of bark from CTV infected plants. Both rat R2 and rabbit 201 anti-p20 antibodies discriminated CTV infected tissue from tissue from healthy plants.

**Acknowledgments.** The current research work had financial support of CONACYT-Mexico, grant 83427 CB 2007-1. The authors thank the Nuevo Leon State Plant Protection Board at Montemorelos, Nuevo Leon, to allow the access to CTV infected trees in the process of being eradicated from groves in General Teran, Nuevo Leon, Mexico.

## LITERATURA CITADA

- Bar-Joseph M, and Lee RF. 1989. Citrus tristeza virus. Description of Plant Viruses No. 353 (No. 33 revised). Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Kew Surrey, England. 7p.
- Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitez M, Purcifull DE, Clark MF, and Loebenstein D. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
- Brlansky RH, and Lee RF. 1990. Numbers of inclusion bodies produced by mild and severe strains of citrus tristeza virus in seven citrus hosts. *Plant Disease* 74: 297-299.
- Ecalle-Zhou CL, Ammar ED, Sheta H, Kelley S, Polek M, and Ullman DE. 2002. *Citrus tristeza virus* ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. *Canadian Journal of Botany* 80: 512-525.
- Esau K, Cronshaw J, and Hoefert LL. 1967. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *The Journal of Cell Biology* 32:71-87.
- Faoro F, Tornaghi R, and Belli G. 1991. Localization of closteroviruses on grapevine thin sections and their identification by immunolabeling. *Journal of Phytopathology* 133:297-306.

muestras en plantas infectadas por el CTV en proceso de erradicación en huertas de General Terán, Nuevo León, México.

- 
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M, and Henderson CT. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). pp 39-50 in: Proc.12<sup>th</sup> Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
- Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, and Dawson WO. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
- Iracheta-Cárdenas M, Sandoval-Alejos BD, Román-Calderón ME, Manjunath KL, Lee RF, and Rocha-Peña MA. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of *Citrus tristeza virus* and their effectiveness for virus detection. *Journal of Phytopathology* 156:243-250.
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowski DJ, and Dawson WO. 1995. Complete sequence of citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Lin Y, Rundell PA, Xie L, and Powell CA. 2000. *In situ* immunoassay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* 84:937-940.
- Medina V, Tian T, Wierzchos J, and Falk BW. 1998. Specific inclusion bodies are associated with replication of lettuce infectious yellows virus RNAs in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. *Journal of General Virology* 79:2325-2329.
- Miao H, and Skaria M. 2002. Quantitative and qualitative differences of inclusion bodies induced by *Citrus tristeza virus*. *Subtropical Plant Science* 54: 1-5.
- Rocha-Peña MA, Lee RF, and Niblett CL. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods* 34:297-309.
- Schneider H. 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), pp. 73-84. Berkeley, CA: University of California Division of Agricultural Sciences.
- Wisler GC, Liu HY, Klaassen VA, Duffus JE, and Falk BW. 1996. Tomato infectious chlorosis virus has a bipartite genome and induces phloem-limited inclusions characteristic of Closteroviruses. *Phytopathology* 86:622-626.
- Wisler GC, Li RH, Liu HY, Lowry DS, and Duffus JE. 1998. Tomato chlorosis virus: A new whitefly-transmitted, phloem limited, bipartite Closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88:402-409.

## Revista Mexicana de Fitopatología (RMF)

### Guía para Autores

Se aceptarán manuscritos en inglés o español de miembros y no miembros de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Los manuscritos podrán ser: Artículos científicos, revisiones, notas de investigación, descripción de variedades y cartas al editor. La publicación es bilingüe y sin costo de traducción. El comité editorial puede solicitar revisiones bibliográficas o contribuciones sobre temas específicos. Para su aceptación, los escritos deben tener las siguientes características:

- 1) Presentar un trabajo original sobre algún aspecto básico o aplicado de la fitopatología.
- 2) Puede ser artículo científico que precise un estudio concluido (repetido en tiempo y espacio), o artículo de revisión sobre hipótesis, teoría u otros temas fitopatológicos.
- 3) Notas fitopatológicas, incluyen originales sobre técnicas, observaciones, aspectos históricos de datos fitopatológicos. No contienen las secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 4) Descripción de variedades o híbridos vegetales, se basa en las características de material vegetativo que manifieste tolerancia o resistencia a enfermedades. No requiere secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 5) Cartas al editor, pueden ser opiniones concisas sobre trabajos fitopatológicos, principios, reseñas de libros o críticas. El comité editorial se reserva el derecho de publicar o rechazar este tipo de artículos.

La estructura de los manuscritos deberá apegarse a las normas editoriales de la revista, por lo que antes de enviarlo al editor será revisado, si no cumple con las normas se regresará al autor. El comité editorial de la RFM se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo, si no reúne los requisitos de calidad, consistencia y originalidad. Se acepta por anticipado que no han sido ni serán enviados a alguna otra revista.

### GUÍA PARA EL FORMATO

**Texto.** Escriba en una forma clara y concisa. Use las palabras con precisión, claridad y economía. Cada oración debe ser exacta y simple. Describa las observaciones y los experimentos en tiempo pasado, use el presente para generalizaciones. Use oraciones directas y evite la voz pasiva; compare: "Las bacterias producen antibióticos" con "los antibióticos son producidos por bacterias". Evite los superlativos y palabras como: "muy", "mucho", "bastante", etc. También evite el uso de gerundios. Utilizar palabras cuando los números sean menores de 10 y sin estar asociados con medidas. Use las palabras técnicas con su significado preciso; acuda al diccionario especializado cuando haya duda. Se escriben en *itálicas* los nombres científicos y expresiones latinas como: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. Los nombres científicos de plantas o agentes fitopatógenos no llevarán descriptor(es). Al terminar de escribir el manuscrito, estudie

### Author's Guide

Manuscripts are accepted in English or Spanish from members and non-members of the Mexican Society of Phytopathological (SMF). Manuscripts may be: scientific articles, reviews, research notes, descriptions of varieties and letters to the editor. The publication is bilingual (English and Spanish) and without translation costs. The editorial board may request literature reviews or contributions on specific topics. For acceptance, the writings must have the following characteristics:

- 1) Submit an original work on some aspect of basic or applied plant pathology.
- 2) Can be a scientific paper that requires completed study (repeated in time and space), or review article on hypothesis, theory or other phytopathology topics.
- 3) Phytopathological notes include original techniques, observations and historical aspects of phytopathology data. They don't contain sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 4) Description of plant varieties or hybrids, it is based on the characteristics of plant material expressing tolerance or resistance to diseases. Does not require sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 5) Letters to the editor may be concise opinions on phytopathological studies, principles, book reviews or critics. The editorial board reserves the right to publish or reject such articles.

The structure of the manuscripts should adhere to the editorial standards of the journal, therefore it will be reviewed before sending it to the editor, and if it fails to meet such standards it will be returned to the author. The editorial board of the RMF reserves the right to refuse any work, if it does not meet the requirements of quality, consistency and originality. It is agreed in advance that they have not been and will not be sent to another journal.

### FORMAT GUIDE

**Text.** Write clearly and concisely. Use words with precision, clarity and economy. Each sentence must be accurate and simple. Describe observations and experiments in the past tense, use the present tense to generalize. Use direct sentences and avoid the passive voice; compare: "The bacteria produce antibiotics" with "antibiotics are produced by bacteria". Avoid superlatives and words like "very", "many", "more", etc. Also avoid the use of gerunds. Use words when numbers are under 10 and not associated with measurements. Utilize technical words with their precise meaning; refer to a specialized dictionary when in doubt. Scientific names and phrases in Latin are written in *italics*, such as: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. The scientific names of plants or plant pathogens will not have descriptor(s). When you finish writing the manuscript, study each sentence to determine whether

cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que en el manuscrito haya cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que el manuscrito haya sido revisado críticamente por sus colaboradores y por dos colegas. Adicionar carta de aprobación de los colaboradores.

Manuscritos. Los textos se escriben con letra Times New Roman, tamaño 12 y con márgenes de 2.5 cm en los cuatro lados. Para artículos científicos y de revisión, el manuscrito no deberá exceder de 20 páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras. Las notas fitopatológicas y la descripción de variedades no deberán exceder de siete páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras. El inicio de cada párrafo llevará sangría de 1 cm (excepto el primer párrafo introductorio). Incluya fotografías originales; si contiene gráficas, envíe los datos originales. Los manuscritos deben enviarse por correo electrónico a: **revmexfitopatologia@prodigy.net.mx** en Microsoft Word. La comunicación de los editores será exclusivamente con el autor de correspondencia. Los manuscritos que sean aceptados serán propiedad de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

#### ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO

**Título.** El título debe identificar el contenido del tema; escriba títulos claros, concisos, específicos, no mayores de 15 palabras. Se debe escribir en mayúsculas y minúsculas, en negritas y centrado, evite iniciar con: "Investigación sobre...", "Estudios sobre...", etc. No se aceptarán títulos que indican una serie de trabajos relacionados, a menos que se envíen juntos. Los nombres científicos se escribirán en cursivas y sin incluir el (los) descriptor(es). En seguida del título en español se escribe el título en inglés.

**Autor-institución.** Abajo del título escriba el nombre completo de los autores con minúsculas, en negritas y justificado. Después de cada autor, escriba con minúsculas y sin negritas el nombre de la institución(es) correspondiente(s). Incluya el departamento, ciudad, estado y código postal, e indique el autor para correspondencia.

Ejemplo: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

**Resumen.** El encabezado deberá escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. El resumen debe sintetizar, en un sólo párrafo, los aspectos más relevantes de la investigación, sin exceder más de 200 palabras. No repita el título en el texto del resumen; use la nomenclatura científica y evite las abreviaturas.

**Palabras clave adicionales.** Debe escribirse en letras

they can be shortened or omitted. Before sending, make sure that the manuscript has been critically reviewed by co-authors and two colleagues. Include letter of approval from co-authors.

Manuscripts. Texts are written in Times New Roman font, size 12 and with margins of 2.5 cm on all four sides. For scientific and revision articles, the manuscript should not exceed 20 pages written in one and a half space, including tables and figures. Phytopathological notes and descriptions of varieties should not exceed seven pages written in one and a half space including tables and figures. The beginning of each paragraph is to be indented 1 cm (except the first introductory paragraph). Include original photographs; if it contains graphs and/or charts, please send the original data. Manuscripts should be submitted by e-mail to **revmexfitopatologia@prodigy.net.mx** in Microsoft Word. Communication from the editors will be exclusively with the corresponding author. Accepted manuscripts will be property of the Mexican Society of Phytopathology. (Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.)

#### MANUSCRIPT ORGANIZATION

**Title.** The title should identify the content of the topic; write titles clear, concise, specific and no more than 15 words. It should be written in uppercase and lowercase letters, in bold and centered, avoid starting with: "Research on...", "Study about...", etc. Titles indicating a series of works will not be accepted, unless they are sent together. Scientific names will be written in italics and not including the descriptor(s). The title in English is written next to the title in Spanish.

**Author-institution.** Write the full names of the authors below the title, in lower case, bold and justified. After each author, write the name of the corresponding institution(s) in lower case and not in bold. Include the department, city, state, zip code, and indicate the corresponding author.

Example: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Department of Plant Genetic Engineering, Center for Research and Advanced Studies Irapuato Unit, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondence: zavaleta@colpos.mx.

**Abstract.** The header must be written in bold, lower case letters and aligned to the left. The abstract should summarize, in a single paragraph, the most important aspects of the research, without exceeding 200 words. Do not repeat the title in the abstract; use scientific nomenclature and avoid abbreviations.

**Additional key words.** Must be written in lowercase letters and aligned to the left. Provide a list of up to six key words below the abstract, for the purpose of international compilation, that are not included in the title of the work.



minúsculas y a la izquierda. Abajo del resumen proporcione una lista de hasta seis palabras clave que sirvan para fines de compilación internacional, que no se incluyan en el título del trabajo.

**Resumen.** Esta sección debe escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. Proporcione una traducción fiel en inglés de lo escrito en el resumen en español.

**Palabras claves adicionales.** Debe escribirse en letras minúsculas y a la izquierda. Abajo del abstract proporcione una traducción fiel en inglés de la lista de las palabras señaladas en la sección de Palabras clave adicionales.

Los títulos de las secciones de Resultados, Discusión, Conclusiones y Literatura Citada, se escriben con mayúsculas, en negritas, en un solo renglón y a la izquierda de la hoja. Los subtítulos se escriben en minúsculas, en negritas y con punto y seguido.

**INTRODUCCIÓN.** Este encabezado se omite. La introducción incluye la descripción del problema. Justifique su investigación con referencias actuales y relevantes, y explique los objetivos del trabajo. La cita de referencias en el texto debe presentarse de la forma siguiente: Hasta dos autores, el apellido y año; más de dos autores, apellido del primer autor y *et al.*, seguido del año de publicación. El uso del paréntesis depende de la estructura general de la oración. Ejemplos: Un autor, Pfender (2010) o (Pfender, 2010); dos autores, Funnell y Pedersen (2009) o (Funnell y Pedersen, 2009); y tres o más autores, Angulo *et al.* (2009) o (Angulo *et al.*, 2009). Si el autor(es) y años son idénticos para más de una referencia, inserte una letra minúscula (en secuencia alfabética) después del año. Ejemplo: Ascencio *et al.* (2008a) o (Ascencio *et al.*, 2008b). Use punto y coma para separar varias referencias. Ejemplo: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

**MATERIALES Y MÉTODOS.** En esta sección se describen los materiales y la metodología empleados con el detalle necesario, como para que otra persona pueda repetir exactamente el procedimiento. Se citará el lugar, fecha, tratamiento, método, diseño experimental, variables evaluadas, forma y época donde se obtuvieron los datos, análisis realizado, comparación de medias y programa estadístico. Cuando se trate de metodologías específicas, indique la referencia bibliográfica de donde se tomó, e indique las modificaciones pertinentes. Presente la información de una manera clara, ordenada y coherente. Use fotografías, cuadros y dibujos, solamente cuando ayuden a aclarar y documentar el texto. Las ilustraciones deben ser funcionales y no repetir el material descrito en el texto.

**RESULTADOS.** Presente datos concisos sobre los principales efectos con base en métodos estadísticos apropiados. Cuando se señalen diferencias entre dos grupos de resultados, mencione la significancia, evite señalar tendencias. La discusión de los resultados se puede presentar bajo un encabezado separado; sin embargo, si el

**Abstract.** This section should be written in bold, lowercase letters and aligned to the left. Provide an accurate translation in Spanish of what was written in English in the Abstract section.

**Additional keywords.** Must be written in lowercase letters aligned to the left. Below the “Resumen” provide an accurate translation in Spanish of the key words list mentioned in the section Additional Key Words.

The titles of sections Results, Discussion, Conclusions, and Literature Cited, are written in capital, bold letters of no more than one line and aligned to the left of the page. Subtitles are written in lowercase, bold letters followed by a semicolon.

**INTRODUCTION.** This header is omitted. The introduction includes a description of the problem. Justify your research with current and relevant references, and explain the objectives of the work. The citation of references in the text should be presented in the following manner: Up to two authors, last name and year; more than two authors, last name of the first author and *et al.*, followed by the year published. The use of parenthesis depends on the general structure of the sentence.

Examples: One author, Pfender (2010) or (Pfender, 2010); two authors, Funnell and Pedersen (2009) or (Funnell and Pedersen, 2009); and two or more authors, Angulo *et al.* (2009) or (Angulo *et al.*, 2009). If the author(s) and year(s) are identical for more than one reference, insert a lower case letter (in alphabetical order) after the year. Example: Ascencio *et al.* (2008a) or (Ascencio *et al.*, 2008b). Use a semicolon to separate multiple references. Example: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

**MATERIALS AND METHODS.** This section describes the materials and methodology employed with the necessary detail, so that someone else can repeat the procedure exactly. Citing the location, date, treatment, method, experimental design, variables measured, manner and time where data were obtained, analysis carried out, comparison of means and statistical program. In the case of specific methodologies, indicate where the bibliographic reference was made, and indicate the necessary modifications. Present information in a clear, orderly and coherent manner. Use photographs, tables, graphs and drawings, only when they help to clarify and document the text. Illustrations must be functional and not repeat the material described in the text.

**RESULTS.** Present concise data on the main effects based on appropriate statistical methods. When you point out differences between two sets of results, mention the significance, do not identify trends. The discussion of the results can be presented under a separate header; however, if the author prefers, both issues can be presented under RESULTS AND DISCUSSION.

**DISCUSSION.** Should interpret the results of the work and

autor lo prefiere, ambos temas se pueden presentar bajo RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

**DISCUSIÓN.** Debe interpretar los resultados del trabajo y relacionarlos con investigaciones previas o con trabajos similares reportados en la literatura, incluir deducciones lógicas, no caer en especulaciones carentes de sustento, además, se pueden añadir sugerencias para estudios futuros.

**CONCLUSIONES.** En este apartado se anotarán de manera breve, sin numeración, las aportaciones concretas al conocimiento en función a los resultados obtenidos en el estudio.

**Agradecimientos.** El encabezado deberá escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. En esta sección se deberá expresar las gratitudes y reconocimientos de personas o instituciones. Puede mencionar la ayuda técnica, económica, o de cualquier otra naturaleza, así como si es parte de una tesis.

**LITERATURA CITADA.** Contendrá la lista de todas las citas mencionadas en el texto, las cuales se presentarán en orden alfabético y en sangría 'francesa'. Se debe incluir sólo trabajos publicados o en prensa, sometidos a procesos formales de arbitraje y edición, accesibles a través de bibliotecas o sistemas de información. No use "anónimo" como referencia, utilice las siglas y el nombre de la institución o fuente que publica la información. La estructura seguirá la secuencia siguiente:

**1. Revistas científicas**

- a) Autor(es). El apellido paterno seguido de las iniciales del apellido materno y nombre(s). Separe con una coma la última inicial del primer autor y siga con el apellido e iniciales de los coautores.
- b) Año de publicación.
- c) Título del trabajo. Sólo la primera letra de la primera palabra en un título en mayúsculas, a menos que se incluyan nombres propios.
- d) Nombre completo de la revista en que fue publicado el trabajo.
- e) Volumen y páginas.

Ejemplos: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:97-110.

**2. Libros**

Autor(es), año, título (en mayúsculas y minúsculas), edición, casa editorial, lugar de publicación y el número de páginas. Ejemplos: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition.

relate them to previous investigations or similar work reported in literature, include logical deductions, do not fall into unsubstantiated speculation, also, suggestions for future research can be added.

**CONCLUSIONS.** This section will contain concrete contributions to knowledge according to the results obtained in the study. They will be written briefly and without numbering.

**Acknowledgements.** The header must be written in bold, lowercase letters, aligned to the left. This section should express gratitude and appreciation of individuals or institutions. You may mention technical, economic or help of any nature, as if part of a thesis.

**LITERATURE CITED.** This will contain the list of all citations mentioned in the text, which will be presented in alphabetical order. It includes only works published or in press, subjected to formal processes of arbitration and editing, accessible through libraries or information systems. Do not use "anonymous" as a reference, use the initials and the name of the institution or source that published the information. The structure will have the following sequence:

**1. Scientific Journals**

- a) Author(s). Last name followed by the initial of mother's surname (if available) and first name(s). Separate with a comma the last initial of the first author and follow with the last names and initials of the co-authors.
- b) Year of publication.
- c) Title of the work. Only the first letter of the first word on the title in capitals, unless proper names are included.
- d) Full name of the journal that published the work.
- e) Volume and pages.

Examples: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:97-110.

**2. Books**

Author(s), year, title (capital and lowercase letters), edition, publisher, place of publication, and number of pages.

Examples: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.

Rueda PJ. 2009. *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. Plaza y Valdés. México. 141p.

**3. Book chapter**

Academic Press. New York, USA. 922p. Rueda PJ. 2009. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Plaza y Valdés. México. 141p.

### 3. Capítulo de libro

Autor(es), año, título (minúsculas), páginas, editor(es), título del libro (mayúsculas y minúsculas), volumen, empresa editora, lugar de la publicación y número total de páginas.

Ejemplos: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In*: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible. Plaza y Valdés. México. 255p.

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In*: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.

### 4. Folletos

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppa N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

### 5. Consultas en web

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8*. [www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/](http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/) (consulta, junio 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, septiembre 2011).

Cuadros. Deben tener títulos entendibles sin necesidad de referirse al texto. Los cuadros deben documentar, pero no duplicar los datos que se presentan en el texto. Incluirlos de manera numerada, según el texto, en hojas separadas y a continuación de la literatura citada. La leyenda se escribe con minúsculas. Identifique las notas al pie de los cuadros con letras minúsculas del final del alfabeto (en secuencia: x, y, z). Para indicar niveles de significancia estadística, utilice asteriscos (\*= p 0.05, \*\*= p 0.01). En cifras usar solo un decimal, p. ej. 3.2% y no 3.195%.

Figuras. Numere cada figura (gráficas dibujos, fotografías, etc.) para que corresponda con la referencia del texto. Las leyendas se deben escribir en minúsculas, en una hoja por separado y anexarse a continuación de los cuadros. Las fotografías deben ser originales y pueden ser en blanco y

Author(s), year, title (lowercase), pages, editor(s), title of the book (capital and lowercase letters), volume, publisher, place of publication and total number of pages.

Examples: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In*: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible. Plaza y Valdés. México. 255p.

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In*: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.

### 4. Booklets

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppa N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

### 5. Web queries

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8*. [www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/](http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/) (consulted, June 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulted, September 2011).

Tables. Titles should be understood without the need to refer to the text. Tables should document, but not duplicate the data presented in the text. Include them listed by number, according to the text, in separate pages, after the Literature Cited section. The legend is written in lowercase letters. Identify the notes at the bottom of the tables with lowercase letters starting with the last (in sequence: x, y, z). To indicate levels of statistical significance, use asterisks (\*= p 0.05, \*\*= p 0.01). Use only one digit after the decimal, for example 3.2% and not 3.195%.

Figures. Number each figure (graph, drawing, photograph, etc.) to match references in the text. Legends should be written in lowercase, in a separate page and attached after the tables. Photographs must be original and can be in black & white or color. Poor quality photographs will not be accepted. Do not write or draw arrows on original photos. Abbreviations and symbols used in the figures should match the same style used in the text. When a set of figures are presented with a single legend, the components will be identified by capital letters of the same type and size.

negro o a color. No se aceptarán fotografías de mala calidad. No escriba o pegue flechas sobre las fotos originales. Las abreviaturas y símbolos usados en las figuras deben concordar con el mismo estilo usado en el texto. Cuando un conjunto de figuras son presentadas con una sola leyenda, los componentes se identificarán con letras mayúsculas del mismo tipo y tamaño.

Fertilizantes. Describa las dosis de fertilizantes en términos elementales (ejemplo: N, P, K, etc.). Si es necesario se puede señalar la fuente del fertilizante.

Plaguicidas. Use el nombre técnico (ingrediente activo) y concentración de los plaguicidas, el nombre comercial puede incluirse en paréntesis. Manuscritos sobre manejo de agroquímicos se considerarán siempre y cuando su contenido aporte nuevos conocimientos técnico-científicos.

Medidas. Se utilizará el sistema métrico decimal. Las abreviaturas serán en singular sin estar seguidas de punto. Las más comunes son:

Celsius = °C  
 Centímetro = cm  
 Gramo = g  
 Hectárea = ha  
 Hora = h  
 Kilogramo = kg  
 Kilogramos por hectárea = kg ha<sup>-1</sup>  
 Kilómetro = km  
 Litro = L  
 Metro = m  
 Micron = μm  
 Miligramo = mg  
 Mililitro = mL  
 Milímetro = mm  
 Milimicra = mμ  
 Minuto = min  
 Nanómetro = nm  
 Segundo = seg  
 Temperatura = temp  
 Tonelada = t

Algunas referencias útiles para escribir artículos científicos en la RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.  
 Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub 1/.

Fertilizers. Describe the doses of fertilizers in terms of elements (e.g.: N, P, K, etc.). If necessary, the source of the fertilizer may be pointed out.

Pesticides. Use the technical name (active ingredient) and concentration of the pesticides, the commercial name may be included in parenthesis. Manuscripts on agricultural chemical management will be considered as long as the content provides new technical and scientific knowledge.

Measurements. The metric system will be used. The abbreviations will be in the singular form and will not be followed by a period. The most common are:

Celsius = °C  
 Centimeter = cm  
 Gram = g  
 Hectare = ha  
 Hour = h  
 Kilogram = kg  
 Kilograms per hectare = kg ha<sup>-1</sup>  
 Kilometer = km  
 Liter = L  
 Meter = m  
 Micron = μm  
 Milligram = mg  
 Milliliter = mL  
 Millimeter = mm  
 Millimicrons = mμ  
 Minute = min  
 Nanometer = nm  
 Second = sec  
 Temperature = temp  
 Ton = t

Some useful references for writing scientific articles in the RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.  
 Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub 1/.