

Ultrastructural changes in blastospores of *Taphrina caerulescens* in the presence of a susceptible and non-host species

Cambios ultraestructurales en blastosporas de *Taphrina caerulescens* en presencia de hospedante susceptible y no susceptible

¹Gregg Evans, ¹Onésimo Moreno-Rico*, ²Joaquín Sosa-Ramírez, ²José de Jesús Luna-Ruíz, ³Celeste Elizabeth Moreno Manzano, ¹Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, ²Departamento de Disciplinas Agrícolas. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad #940, Ciudad Universitaria, CP. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes. México, ³Centro de Bachillerato Tecnológica Agropecuaria, Calvillo, Aguascalientes. *Autor para correspondencia: omoreno@correo.uaa.mx.

Recibido: 28 de Febrero, 2019.

Aceptado: 12 de Abril, 2019.

Evans G, Moreno-Rico O, Sosa-Ramírez J, Luna-Ruíz JJ and Moreno-Manzano CE. Ultrastructural changes in blastospores of *Taphrina caerulescens* in the presence of a susceptible and non-host species. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 318-329.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1902-5

Primera publicación DOI: 25 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 25, 2019.

Resumen. *Taphrina caerulescens* es un hongo fitopatígeno de encinos, que causa ampollas en hojas de 50 especies de *Quercus*. En 2015, el hongo se aisló por primera vez de *Quercus eduardii*, especie de encino endémica de la Sierra Fría de Aguascalientes, México. El objetivo de este estudio fue documentar los cambios que se producen en el inoculo fúngico antes de la infección de su hospedante a medida que cambia de saprófito a parásito. Se utilizaron dos especies de plantas hospedantes: *Q.*

Abstract. *Taphrina caerulescens* is a fungal pathogen of oak trees, it causes the disease leaf blister in 50 reported *Quercus* spp. In 2015, the fungus was isolated for the first time from *Quercus eduardii*, an oak species endemic to the Sierra Fria of Aguascalientes, Mexico. The objective of this study was to document the changes that occur in the inoculum prior to infection of its host as it changes from saprophytic to parasitic. Two host plant species were used: *Q. eduardii* and *Q. potosina* and one non-host species *Pittosporum tobira*. Portions of leaf tissue 24 h, 48 h and 72 h post inoculation with a suspension of *T. caerulescens* conidia were analysed with a scanning electron microscope. Moderate budding was observed after 24 h on *Quercus* samples; after 48 h increased budding on both *Quercus* spp. and the formation of blastospores significantly smaller than the original inoculum was observed on the *Quercus eduardii* samples. Formation of germ tubes was verified after 48 h on *Quercus eduardii*. The germinative

eduardii y *Q. potosina*, y una especie no hospedante, *Pittosporum tobira*. En el microscopio electrónico de barrido se analizaron muestras de hojas 24 h, 48 h y 72 h post inoculación con una suspensión de conidios de *T. caerulescens*. Se observó una gemación moderada de conidios después de 24 h en muestras de *Quercus*; después de 48 h la gemación incrementó en las dos especies de *Quercus* y se observó la formación de blastosporas significativamente más pequeñas, que el inóculo original en las muestras de *Quercus eduardii*. La formación de tubos germinativos de las blastosporas pequeñas se comprobó después de 48 h en *Quercus eduardii*. Los tubos germinativos se observaron creciendo de manera aleatoria hacia las estomas. No se observaron cambios significativos en las muestras no hospedantes. No existe otro reporte de blastosporas pequeñas en *T. caerulescens*.

Palabras claves. Conidio, tubos germinativos, infección, *Quercus* spp., ampollas de las hojas.

Existen pocos estudios sobre el género *Taphrina*, que pertenece a la clase Taphrinomycetes. El orden Taphrinales está formado por dos familias (Protomycetaceae y Taphrinaceae), ocho géneros y 140 especies. El género *Taphrina* contiene solo parásitos de plantas vasculares y causa deformación de los tejidos vegetales (Rodrigues y Fonseca, 2003; Fonseca y Rodrigues, 2011).

Taphrina caerulescens es el hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad conocida como ampolla de la hoja del encino. Cuando este fitopatógeno infecta las hojas jóvenes estimula la hipertrofia y la hiperplasia de las células del hospedero. El crecimiento celular anormal produce la formación de lesiones irregulares y abultadas en las hojas infectadas; las lesiones pueden medir desde unos cuantos milímetros de diámetro o deformar toda la

tubes were observed growing randomly towards the stomata. No significant changes were observed on the surface of the non-host samples. There is no other report of these smaller blastospores in *T. caerulescens*.

Key words: conidia, germ tubes, infection, *Quercus* spp., leaf blister

The genus *Taphrina* is a poorly studied ascomycete that belongs to the class Taphrinomycetes. The order Taphrinales includes two families (Protomycetaceae and Taphrinaceae), eight genera and 140 species. *Taphrina* contains only parasites of vascular plants and causes deformations of plant tissues (Rodrigues and Fonseca, 2003; Fonseca and Rodrigues, 2011).

Taphrina caerulescens is the plant pathogenic fungus responsible for the disease oak leaf blister. Once the young leaves are successfully infected, it stimulates hypertrophy and hyperplasia of the host cells. This abnormal cell growth eventually leads to the formation of raised, irregular lesions on the infected leaves, these lesions can measure from a few millimetres in diameter or deform the entire leaf surface. Oak leaf blister results in an accelerated rate of necrosis and premature leaf senescence and death of infected leaves (Taylor and Birdwell, 2000; Horst, 2008).

In 2015 symptoms of the disease leaf blister caused by *T. caerulescens* were observed severely affecting *Quercus* spp. in the Sierra Fría of Aguascalientes, Mexico. This was the first time that the disease was reported in Mexico (Moreno-Rico *et al.*, 2015).

All members of the genus *Taphrina* are dimorphic with parasitic and saprophytic phases. During the parasitic phase, *Taphrina* spp. infects leaves at bud break (Rossi and Languasco, 2007). The infective

superficie de la hoja. La ampolla de la hoja del encino causa una tasa acelerada de necrosis y senescencia prematura en las hojas y muerte de las hojas infectadas (Taylor y Birdwell, 2000; Horst, 2008).

En 2015, se observó que los síntomas de la ampolla del encino causados por *T. caerulescens* afectaron severamente *Quercus* spp. en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. Esa fue la primera vez que la enfermedad se reportó en México (Moreno-Rico *et al.*, 2015).

Todos los miembros del género *Taphrina* son dimórficos con fases parasitaria y saprofítica. En la fase parasitaria, *Taphrina* spp. infecta las hojas durante la apertura de las yemas (Rossi y Languasco, 2007). La fase infecciosa son las blastosporas (también llamadas conidios) que se originan en las ascosporas como resultado de la gemación. En *T. caerulescens* no es común observar ascosporas en las ascas (Nagao y Katumoto, 1998; Fonseca y Rodrigues, 2011). Por lo general, las blastosporas son esféricas a ovoides, uninucleadas y haploides, las cuales continúan dividiéndose después de que se forman, pero si entran en contacto con un hospedero adecuado forman un tubo germinativo e infectan el tejido del hospedante a través de los estomas (Nagao y Katumoto, 1998; Taylor y Birdwell, 2000).

El objetivo de este estudio fue observar los cambios que se producen en el inóculo (conidios/blastosporas), antes de que la hoja del hospedero sea infectada a medida que cambia de saprófito a parásito, de un nuevo aislado que se encuentra infectando especies endémicas de encino en México.

El parque nacional de la Sierra Fría abarca una superficie de 1419 km² y se eleva a una altitud de aproximadamente 2450 metros. El parque se encuentra en las siguientes latitudes: N: 21° 52' 45" - 23° 31' 17", y longitudes O: 102° 22' 44" - 102° 50' 53". *Quercus* spp. constituye la comunidad más grande de árboles. La Sierra Fría se caracteriza

phase are the blastospores (also called conidia), which originate from the ascospores as a result of budding. In *T. caerulescens* it is not common to observe ascospores within the asci (Nagao and Katumoto, 1998; Fonseca and Rodrigues, 2011). Generally, the blastospores are spherical to ovoid, uninucleate and haploid and once formed they continue to divide, but, if they come into contact with a suitable host it will form a germ tube and infect the host tissue via the stomata (Nagao and Katumoto, 1998; Taylor and Birdwell, 2000).

The objective of this study was to observe the changes that occur in the inoculum (conidia/blastospores) prior to infection of the leaf host as it changes from saprophytic to parasitic of a new isolate found infecting an endemic oak species of Mexico.

The Sierra Fria national park has an area of 1419 km² and rises to an altitude of approximately 2450 meters. The park is located between the following Latitudes: N: 21° 52' 45" – 23° 31' 17" and Longitudes W: 102° 22' 44" – 102° 50' 53". *Quercus* spp. make up the largest community of trees. The Sierra Fria is characterized as having a sub humid temperate climate (Arriaga *et al.*, 2000).

Leaf tissue of *Quercus eduardii* bearing mature asci of *Taphrina caerulescens* was fastened to petri dish lids over potato dextrose agar (PDA) (potato extract 4 g, dextrose 20 g, agar 20 g, distilled water 1.0 L, final pH, 5.6±0.2) (Nagao and Katumoto, 1998; Taylor and Birdwell, 2000). Spores were discharged onto the PDA medium within 24 h. The colonies that formed were transferred to fresh media and incubated at 20 °C. The resulting colonies grew as yeast-like cells and exhibited frequent budding. No mycelial development was observed, characteristics consistent with previous reports: yeast-like cells that exhibited frequent budding, with colonies opaque to pale pink in colour, turning a darker shade of pink with age. They

por su clima templado subhúmedo (Arriaga *et al.*, 2000).

El tejido de hojas de *Quercus eduardii* que contenía ascas maduras de *Taphrina caerulescens* se fijó en las tapas de placas Petri sobre papa-dextrosa-agar (PDA) (4 g de extracto de papa, 20 g de dextrosa, 20 g de agar, 1.0 L de agua destilada, pH final 5.6±0.2) (Nagao y Katumoto, 1998; Taylor y Birdwell, 2000). Las esporas fueron descargadas en un medio de cultivo PDA por 24 h. Las colonias que se formaron fueron transferidas a un nuevo medio de cultivo e incubadas a 20 °C. El crecimiento de las colonias formadas fue parecido al de las células de la levadura y mostraron frecuente gemación. No se observó desarrollo micelial, características congruentes con reportes anteriores: células parecidas a las de la levadura que mostraron frecuente gemación, con colonias opacas a rosa claro, que adquirirían un tono de rosa más oscuro con la edad. Las colonias eran circulares con márgenes completos en la base y consistencia viscosa, de apariencia suave y brillante (Nagao y Katumoto, 1998; Taylor y Birdwell, 2000; Rodrigues y Fonseca, 2003).

Las semillas se lavaron varias veces, primero con agua de la llave a la que se agregó Tween al 80% por 5 min, y posteriormente con una solución de etanol al 70% por 45 s; inmediatamente después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% por 20 min; por último, se enjuagaron tres veces más con agua destilada estéril (Lindsey *et al.*, 2017). Las semillas fueron germinadas en condiciones asépticas y después transferidas a recipientes estériles transparentes de 1.0 L. Para asegurarse de que las muestras de suelo estuvieran libres de otros patógenos, se esterilizaron en autoclave a 121 °C a 1.1 atm (aprox. 16 lbs pulg⁻¹; 1.137 kg cm⁻¹) durante 15 min como mínimo, tres días consecutivos.

Se utilizaron dos métodos de inoculación. La primera de las pruebas se realizó aplicando el

were circular with entire margins at the base and viscid in consistency, having a smooth, glistening appearance (Nagao and Katumoto, 1998; Taylor and Birdwell, 2000; Rodrigues and Fonseca, 2003).

The seeds were washed multiple times, first, with tap water containing tween 80% for 5 min, then with a 70% ethanol solution for 45 secs immediately after they are to be rinsed three times with distilled sterilized water and then immersed in a 1.0% sodium hypochlorite solution for 20 min and finally rinsed three more times in distilled sterilized water (Lindsey *et al.*, 2017). The seeds were germinated under aseptic conditions and then transferred to 1.0 L clear sterile containers. To ensure that the soil samples were free from other pathogens it was autoclaved at 121 °C at 1.1 atm (approx. 16 lbs in⁻¹; 1.137 kg cm⁻¹) for a minimum of 15 min, for three consecutive days.

Two inoculation methods were used. The first of these tests was carried out using a modification of the detached leaf method according to Rossi *et al.* (2006), who realized similar test with *Taphrina deformans* with leaves of *Prunus persica*. Two days after the leaves emerged from the buds, these were detached from plants and sterilized in a 1.0% sodium hypochlorite solution for 60 secs, they were then rinsed three times in sterilized distilled water before being placed onto a moist sterile filter paper (Whatman 90 mm diameter) in a sterilize plastic petri dish 90 x 15 mm of the brand Interlux, the leaves were then inoculated on the abaxial or lower surface. A total of five leaves of each plant species were placed in four petri dishes, three of the petri dishes with leaves were inoculated with the suspension of *T. caerulescens* and the other sample was inoculated with pure sterilized water. This was repeated three times.

The second method the entire plant was used. The plants were grown in one L sterile plastic transparent containers and were approximately six - month-old. Although the plants were grown

método de la hoja desprendida, con una modificación, de acuerdo con Rossi *et al.* (2006), quienes realizaron una prueba similar con *Taphrina deformans* utilizando hojas de *Prunus persica*. Dos días después de que las hojas emergieron de las yemas, se separaron de las plantas y se esterilizaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% por 60 s; a continuación, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril antes de colocarlas sobre papel filtro estéril húmedo (Whatman de 90 mm de diámetro) en una placa Petri estéril de 90 x 15 mm de la marca Interlux; posteriormente las hojas fueron inoculadas en la superficie abaxial o inferior. Un total de cinco hojas de cada especie vegetal se colocaron en cuatro placas Petri; tres placas con hojas fueron inoculadas con la suspensión de *T. caerulescens* y la otra muestra fue inoculada con agua pura estéril. Este procedimiento se repitió tres veces.

En el segundo método se utilizó toda la planta. Las plantas, que tenían aproximadamente seis meses de edad, se sembraron en recipientes de plástico transparente de 1 L. Aunque las plantas se sembraron en condiciones asépticas, 30 días antes de realizar las pruebas, fueron tratadas con fungicida oxiclورو de cobre (Cupravit®, Bayer Crop science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada experimento se utilizaron cuatro recipientes con cinco plantas en cada uno, tres de los cuales fueron inoculados con la suspensión del inóculo y la cuarta con agua pura estéril. El experimento se repitió tres veces.

El inóculo de *T. caerulescens* se obtuvo de un aislado con crecimiento activo de 14 días que fue sembrado en medio de cultivo PDA a 20 °C. Las blastosporas fueron suspendidas en agua destilada estéril con Tween 80 al 0.01%. La suspensión final fue de aproximadamente 1.35×10^9 conidios/mL, la cual posteriormente se roció en la superficie inferior de las hojas desprendidas, de dos días de edad, y hojas unidas al tallo (Taylor y Birdwell, 2000).

in aseptic conditions they were treated with the fungicide Copper oxychloride (Cupravit®, Bayer Crop science) according to manufacturer's instructions, 30 days before tests were carried out. For each experiment four containers containing five plants each were used, three of which were inoculated with the inoculum suspension and the fourth with pure sterilized water. The experiment was repeated three times.

The inoculum of *T. caerulescens* was obtained from an actively growing 14-days isolate which was cultured on PDA medium at 20 °C. The blastospores were suspended in sterile distilled water with 0.01% Tween 80. The final suspension was approximately 1.35×10^9 conidia/mL, this was then atomized onto the lower surfaces of old detached and attached leaves (Taylor and Birdwell, 2000). In separate containers plants were also inoculated with sterile distilled water. The containers with inoculated seedlings were covered and maintained in a growth chamber (20 °C). One non-hosts species *Pittosporum tobira* was also inoculated in the same manner with the blastospores suspension. For microscopic analysis samples were taken at 24 h, 48 h, and 72 h post inoculation.

The specimens were analysed at 10 KV and 12 KV using scanning electron microscopy (SEM) with the JSM-35C® (JEOL LTD, Tokyo, Japan) in the Electronic Microscopy laboratory of the Department of Biology of the Autonomous University of Aguascalientes. Each specimen was fixed in 3% glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium phosphate (pH 7.2) for 1.5 h at room temperature, and then processed according to Dykstra and Reuss (2003). The dimensions (length and width) of the original blastospores as well as the secondary blastospores were analysed, the averages. To determine whether or not the dimensions of the two groups of blastospores were similar their averages were compared using the

Las plantas en recipientes separados también fueron inoculadas con agua destilada estéril. Los recipientes con las plántulas inoculadas fueron cubiertas y se mantuvieron en una cámara de crecimiento (20 °C). Asimismo, una especie no hospedera de *Pittosporum tobira* fue inoculada de la misma manera con la suspensión de blastosporas. Para el análisis microscópico se tomaron muestras a las 24 h, 48 h y 72 h después de la inoculación.

Los especímenes se analizaron a 10 KV y 12 KV usando un microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japón) en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Cada uno de los especímenes se fijó en glutaraldehído al 3% en una solución amortiguadora de 0.1 M fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.2) por 1.5 h a temperatura ambiente, y después se procesó de acuerdo con el método de Dykstra y Reuss (2003). Se analizaron las dimensiones (largo y ancho) de las blastosporas originales y de las blastosporas secundarias, y se obtuvieron los promedios. Para determinar si las dimensiones de los dos grupos de blastosporas eran similares, se hizo una comparación de promedios utilizando la prueba *t*-Student. Se analizaron también la tasa de gemación de las blastosporas después de 24 h, 48 h y 72 h, y el crecimiento direccional de los tubos germinativos.

La microscopía electrónica de barrido reveló que las blastosporas en las hojas de *Quercus* spp. tuvieron gemación moderada 24 h después de la inoculación, y que en las hojas de *Q. eduardii* (Figuras 1 A-B) y de *Q. potosina* (Figuras 1 C-D) aumentó significativamente después de 48 h y 72 h. No se observaron cambios significativos en las hojas de la especie no hospedera e incluso después de 72 h (Figuras 1 E-F) no se observó gemación. Después de 48 h, se observaron numerosas blastosporas más pequeñas (Figura 2 A-B) de $0.87 - 1.77 \mu\text{m} \times 0.191 - 0.485 \mu\text{m}$ en las ho-

t-Student test. The budding rate of the blastospores after 24 h, 48 h and 72 h and the directional growth of the germination tubes were also analysed.

Scanning electron microscopy revealed that the blastospores on *Quercus* spp., leaves exhibited moderate budding 24 h post inoculation and increased significantly after 48 h and 72 h on leaves of *Q. eduardii* (Figures 1 A-B). and *Q. potosina* (Figures 1 C-D). There were no significant changes observed on the leaves of the non-host species even after 72 h (Figures 1 E-F) no budding was observed. After 48 h, multiple smaller blastospores (Figure 2 A-B) with dimensions $0.87 - 1.77 \mu\text{m} \times 0.191 - 0.485 \mu\text{m}$ were observed on the leaves of *Q. eduardii*. A descriptive analysis of the measurements produced the following scores (n=30): length: medium = $1.41 \mu\text{m}$, s=0.05, SD (standard deviation) = $0.27 \mu\text{m}$ for the width the values were: medium = $0.34 \mu\text{m}$, s=0.01, SD=0.08 μm .

The dimensions of these smaller blastospores were compared to the blastospores which were originally inoculated. The dimensions of the original blastospores were $3.06 - 5.49 \mu\text{m} \times 1.09 - 3.01 \mu\text{m}$, and a descriptive analysis of the measurements (n=30) were as follows, length: medium = $4.12 \mu\text{m}$, s=0.12, SD=0.68 μm for the width the values were: medium = $1.94 \mu\text{m}$, s=0.09, SD = 0.50 μm . To compare the difference between the two sets of blastospores a *t*-Student test was carried out. On comparing the width of the secondary blastospores (medium = $0.34 \mu\text{m}$) and the width of the original blastospores (medium = $1.94 \mu\text{m}$), the difference between the two means was significant, *t*-Student test = -17.69, $p < .005$. There was also a statistically significant differences between the length of the secondary blastospores (medium = $1.41 \mu\text{m}$) and the original blastospores (medium= $4.12 \mu\text{m}$), *t*-Student test = -23.05, $p < .005$.

Once formed the secondary blastospores produced germ tubes. The formation of germ tubes

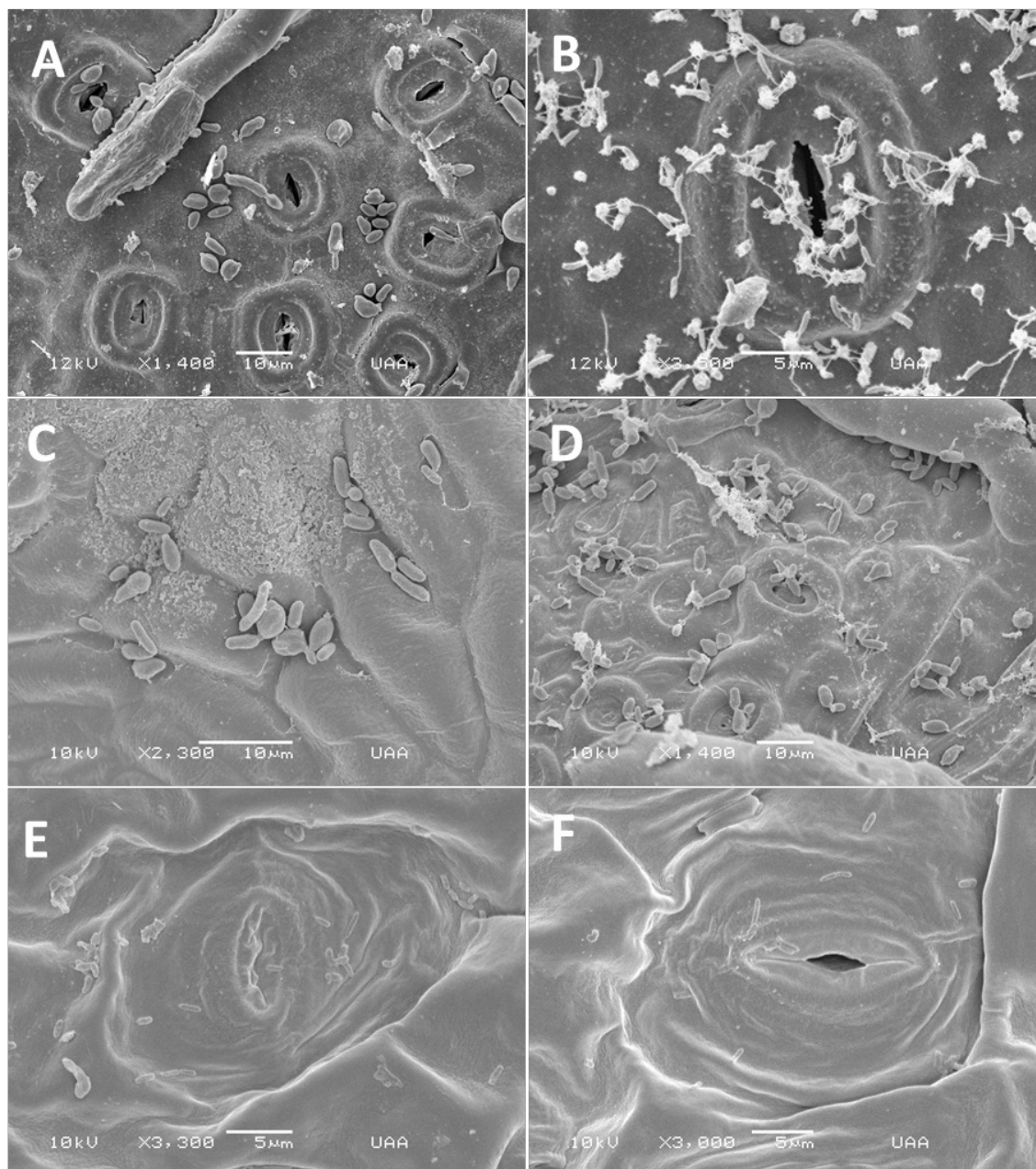


Figura 1. MEB de blastosporas en hojas inoculadas. A. Blastosporas en *Q. eduardii* 24 h después de la inoculación. B. Blastosporas en *Q. eduardii* 72 h después de la inoculación. C. Formación de blastosporas en *Q. potosina* 24 h después de la inoculación. D. Formación de blastosporas en *Q. potosina* 72 h después de la inoculación. E. Blastosporas en *P. tobira* 24 h después de la inoculación. F. Blastosporas en *P. tobira* 72 h después de la inoculación.

Figure 1. SEM of blastospores on inoculated leaves. A. Blastospores on *Q. eduardii* 24 h after inoculation. B. Blastospores on *Q. eduardii* 72 h after inoculation. C. Blastospore development on *Q. potosina* 24 h after inoculation. D. Blastospore development on *Q. potosina* 72 h after inoculation. E. Blastospores on *P. tobira* 24 h after inoculation. F. Blastospores on *P. tobira* 72 h after inoculation.

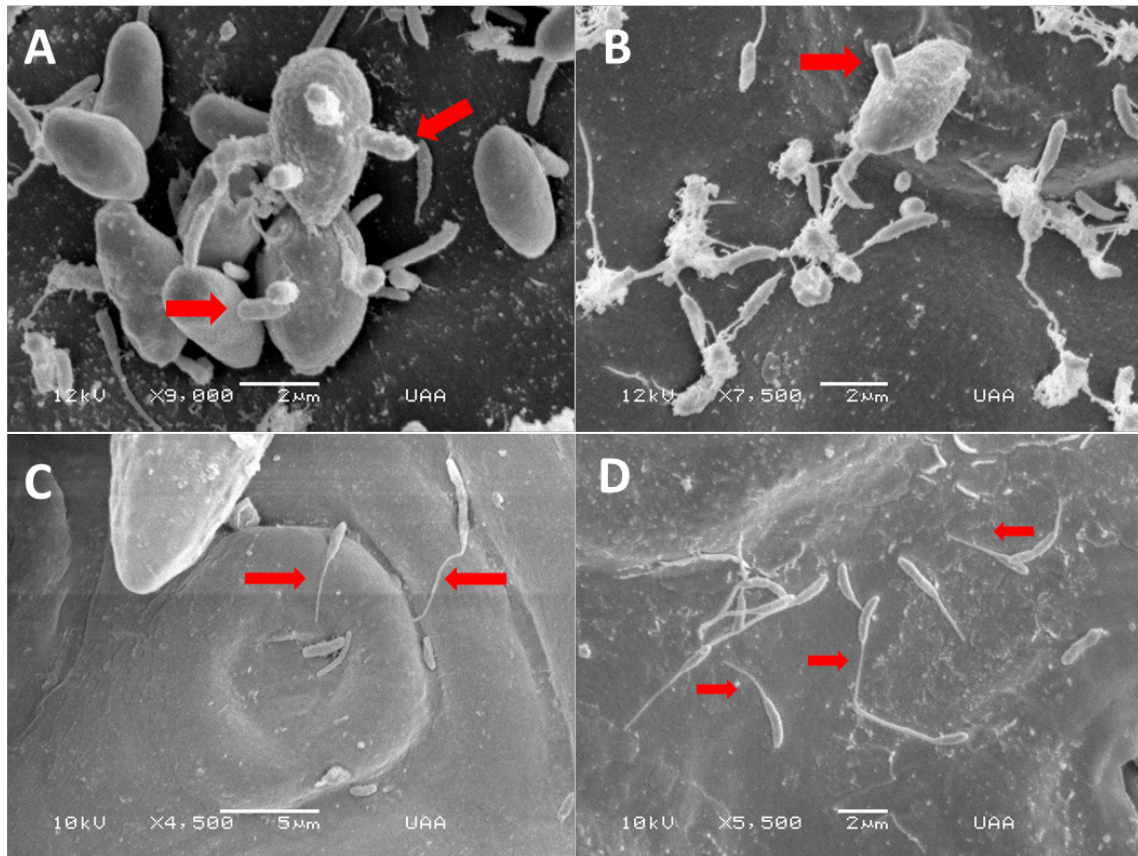


Figura 2. MEB del desarrollo de blastosporas secundarias. A-B Formación de múltiples blastosporas secundarias en la superficie del inóculo original (las flechas señalan las blastosporas secundarias). C. Tubos germinativos formados en el extremo apical de las blastosporas secundarias que crecen hacia los estomas. D. Tubos germinativos con patrón de crecimiento es al azar (las flechas señalan los tubos germinativos).

Figura 2. SEM of developing secondary blastospores. A-B Multiple secondary blastospores forming on the surface of the original inoculum (arrows showing secondary blastospores). C. Germination tubes formed on the apical end of the secondary blastospores growing towards the stomata. D. Germination tubes growing in a randomized pattern (arrows showing germination tubes).

jas de *Q. eduardii*. Un análisis descriptivo de las mediciones arrojó las siguientes medidas (n=30): largo: media = 1.41 μm , s=0.05, SD (desviación estándar) = 0.27 μm de largo, para el ancho los valores fueron: media = 0.34 μm , s = 0.01, SD = 0.08 μm .

Se hizo una comparación de las dimensiones de las blastosporas más pequeñas con las de las blastosporas originalmente inoculadas. Las dimensiones de las blastosporas originales fueron 3.06 – 5.49 $\mu\text{m} \times$ 1.09 – 3.01 μm , y el análisis descriptivo

was recorded 48 h after inoculation in *Q. eduardii*. Although many germ tubes grew towards the stomata (Figure 2C) many were observed growing very randomly (Figure 2D). On average the germ tubes measured 1.69 μm after 48 h and 5.18 μm after 72 h.

Although budding was observed on the surface of *Q. potosina* after 48 h post inoculation no secondary blastospores were observed there was also no formation of germ tubes. Disease symptoms

de las mediciones ($n = 30$) fue el siguiente: media = $4.12 \mu\text{m}$, $s = 0.12$, $SD = 0.68 \mu\text{m}$ para el ancho los valores fueron: media = $1.94 \mu\text{m}$, $s = 0.09$, $SD = 0.50 \mu\text{m}$. Para comparar la diferencia entre los dos grupos de blastosporas se realizó una prueba t -Student. Al comparar el ancho de las blastosporas secundarias (media = $0.34 \mu\text{m}$) con el ancho de las dimensiones de las blastosporas originales (media = $1.94 \mu\text{m}$), se observó una diferencia significativa entre las dos medias, prueba t -Student = -17.69 , $p < .005$. Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre la longitud de las blastosporas secundarias (media = $1.41 \mu\text{m}$) y la de las blastosporas originales (media = $4.12 \mu\text{m}$), prueba t -Student = -23.05 , $p < .005$.

Cuando terminaron de formarse, las blastosporas secundarias produjeron tubos germinativos. La formación de los tubos germinativos se registró 48 h después de la inoculación en *Q. eduardii*. Aunque muchos de los tubos germinativos crecieron hacia los estomas (Figura 2C), se observó que algunos crecieron al azar (Figura 2D). En promedio, los tubos germinativos midieron $1.69 \mu\text{m}$ después de 48 h, y $5.18 \mu\text{m}$ después de 72 h.

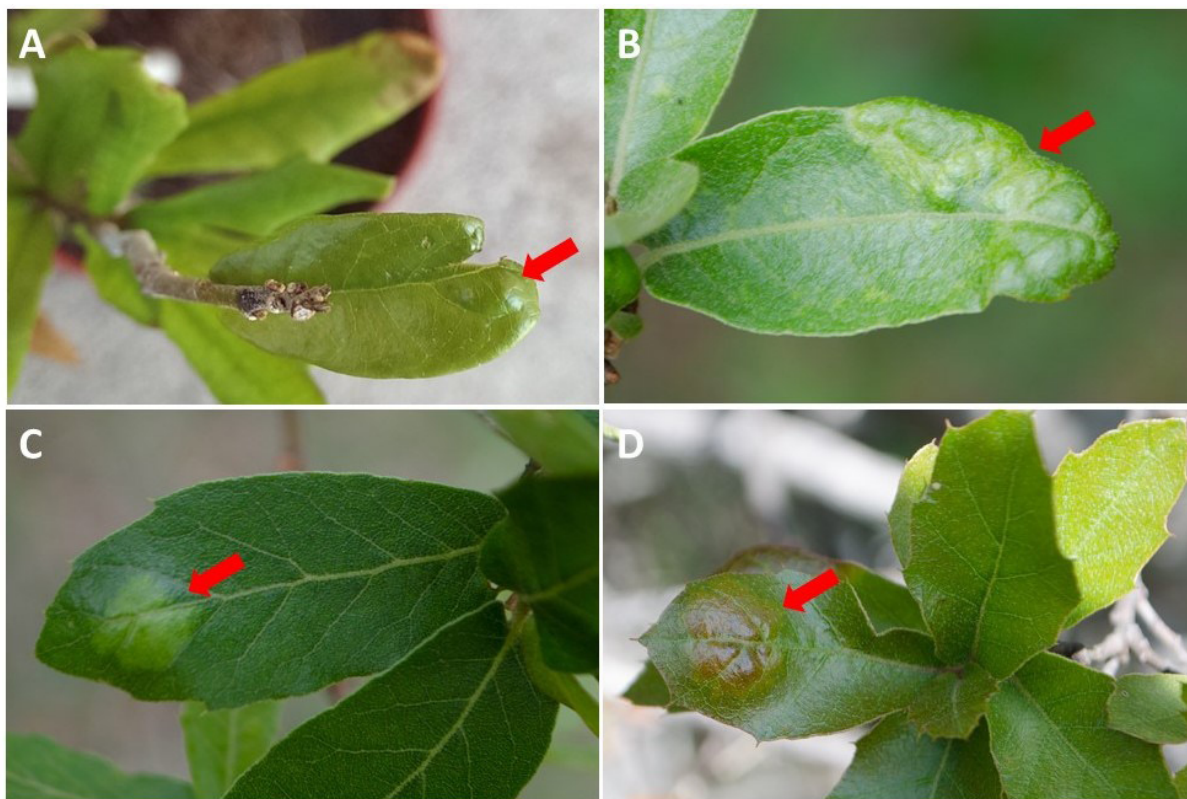
Aunque hubo gemación en la superficie de *Q. potosina* 48 h después de la inoculación, no se observaron blastosporas secundarias y tampoco hubo formación de tubos germinativos. Los síntomas de la enfermedad se manifestaron después de un mes únicamente en las hojas de *Q. eduardii*, en 30% de las plantas que fueron inoculadas (Figuras 3 A-D). Estos resultados son similares a los obtenidos por Taylor y Birdwell (2000).

Desde que Taylor y Birdwell publicaron los resultados de su estudio en 2000, no ha habido ningún otro estudio detallado de la interacción entre *Quercus* spp. y *T. caerulescens*. Una de las principales diferencias entre el presente estudio y el estudio de Taylor y Birdwell reside en que, en el presente estudio se utilizó un aislado de *T. caerulescens*

developed only on the leaves on *Q. eduardii* in 30% of the plant that were inoculated after one month (Figures 3 A-D), these results are similar to Taylor and Birdwell (2000).

Since the 2000 study of Taylor and Birdwell there has been no other comprehensive study into the interaction between *Quercus* spp. and *T. caerulescens*. One of the major differences between the present and the study of Taylor and Birdwell is that, in this present study an isolate of *T. caerulescens* obtained from *Quercus eduardii* (white oak) which is endemic to the Sierra Fria, Aguascalientes was used, whereas, the isolate used by Taylor and Birdwell in their experiments was derived from *Quercus nigra* (red oak) native to the eastern and south-central United States and can be found growing in all the coastal states. Taylor and Birdwell (2000) concluded that after 48 h germ tubes formed, this research confirms their observations that germ tubes formed after 48 h of contact with a suitable host. Many germ tubes grew towards the stomata; however, they were also observed growing arbitrarily (growing over and away from opened stomatal pores). This growth pattern was also described by Taylor and Birdwell (2000), they claimed that germ tubes frequently grew to extensive lengths and that the longer germ tubes growth appeared random rather than directional. The growth pattern exhibited by the germ tubes has led to the hypothesis that the orientation of the germ tubes is being affected by other factors in addition to chemotactic gradients emanating from the stomata (carbon dioxide concentration) however, because of the limited scope of this investigation it was not possible to determine the other factors involved.

Taylor and Birdwell (2000) stated the germ tubes formed from the apical ends of the original cells (conidia/blastospores) that were used to inoculate the leaves. This present study provides



**Figura 3. Formación de ampollas en hojas de *Q. eduardii* 40 días después de haber sido inoculadas con *T. caerulescens*.
Figure 3. Formation of leaf blisters on a leaves of *Q. eduardii* 40 days after being inoculated with *T. caerulescens*.**

obtenido de *Quercus eduardii* (encino blanco), que es endémico de la Sierra Fría, Aguascalientes, en tanto que en sus experimentos, Taylor y Birdwell utilizaron uno derivado de *Quercus nigra* (encino rojo) originario de la región del este y sur-centro de Estados Unidos, que crece en los estados de la zona costera. Taylor y Birdwell (2000) llegaron a la conclusión de que los tubos germinativos se formaron después de 48 h; el presente estudio confirma sus observaciones respecto a que los tubos germinativos se formaron 48 h después de entrar en contacto con un hospedante adecuado. Aunque muchos de los tubos germinativos crecieron hacia los estomas, se observó que también crecieron arbitrariamente, es decir, crecieron encima y fuera de los poros

a stark contrast to their findings. The isolate from the Sierra Fria behaved in a very distinctive manner, the original conidia first produced a number of significantly smaller cells which were dubbed secondary blastospores. These secondary blastospores were the only cells capable of forming germ tubes, no germ tubes were ever observed originating from the larger blastospores. This investigation presents the first findings of these secondary blastospores.

Another finding of interest is that although the isolate used was obtained from *Q. eduardii*, it was capable of multiplying on the surface of *Q. potosina*, thereby weakening the argument that the *T. caerulescens* (at least this isolate) is ultra-specific

estomáticos abiertos. Este patrón de crecimiento fue también descrito por Taylor y Birdwell (2000), quienes afirmaron que los tubos germinativos con frecuencia crecían hasta alcanzar grandes longitudes y que el crecimiento de los tubos germinativos más largos parecía ser al azar más bien que direccional. Debido al patrón de crecimiento de los tubos germinativos ha surgido la hipótesis de que la orientación de éstos está siendo afectada por otros factores además de los gradientes quimiotácticos que emanan de los estomas (concentración de dióxido de carbono). Sin embargo, dado el limitado alcance de esta investigación, no fue posible determinar los otros factores que intervienen.

Taylor y Birdwell (2000) mencionaron que los tubos germinativos se formaron desde los extremos apicales de las células originales (conidios/blastosporas) que se utilizaron para inocular las hojas. Este estudio presenta un marcado contraste con los resultados obtenidos por Taylor y Birdwell. El aislado de la Sierra Fría se comportó de manera muy diferente, ya que los primeros conidios originales produjeron un número de células significativamente más pequeñas que fueron consideradas como blastosporas secundarias. Las blastosporas secundarias fueron las únicas células que pudieron formar tubos germinativos; no se observó que las blastosporas más grandes produjeran tubos germinativos. En esta investigación se da a conocer, por primera vez, la formación de estas blastosporas secundarias.

Otro resultado de interés es que, aunque el aislado que se utilizó se obtuvo de *Q. eduardii*, éste tuvo la capacidad de multiplicarse en la superficie de *Q. potosina* y, por tanto, debilita el argumento de que *T. caerulescens* (al menos este aislado) es ultraespecífico y no tiene la capacidad de crecer en otra especie de *Quercus* además de las especies de las cuales se obtuvo el aislado (Taylor y Birdwell, 2000). Los investigadores atribuyeron este nuevo

and not capable of growth on another *Quercus* spp apart from the species that it was isolated from (Taylor and Birdwell, 2000). Researches attributed this new finding to the fact that in Mexico, there is a high degree of hybridization among the endemic species of *Quercus* spp. (Valencia, 2004) and it is possible that because of this similitude of the genetic information among these species this isolate can grow and possibly infect multiple *Quercus* spp.

In this study, it was determined that the blastospores of this isolate of *T. caerulescens* found infecting *Q. eduardii* of the Sierra Fria of Aguascalientes, were not capable of directly forming germination tubes, instead, the original inoculum formed numerous smaller blastospores which formed germination tubes. This research is the first time that these secondary blastospores have been observed in *Taphrina* spp. The study also showed that although the blastospores were capable of multiplying on *Q. potosina* no germination tubes were formed.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

hallazgo al hecho de que en México existe un alto grado de hibridación entre las especies endémicas de *Quercus* spp. (Valencia, 2004), y que es posible que debido a la similitud de la información genética de estas especies este aislado se desarrolle y posiblemente infecte múltiples especies de *Quercus*.

En el presente estudio se determinó que las blastosporas del aislado de *T. caerulescens* que infectaron la especie *Q. eduardii* de la Sierra Fría de Aguascalientes no tuvieron la capacidad de formar tubos germinativos directamente, y que, en lugar de esto, el inóculo original produjo numerosas blastosporas pequeñas que formaron tubos germinativos. En esta investigación se reporta por primera vez la observación de blastosporas secundarias en

*Taphrina* spp. Asimismo, nuestro estudio muestra que, aunque las blastosporas tuvieron la capacidad de multiplicarse en *Q. potosina*, no hubo formación de tubos germinativos.

## LITERATURA CITADA

- Arriaga L, Espinoza JM, Aguilar C, Martínez E, Gómez L and Loa E. 2000. Regiones Terrestres Prioritarias de México. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 609 p. <http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/1036.pdf>
- Dykstra MJ, and Reuss LE. 1993. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. 1st edition. Boston, MA. Springer. USA. 1–73. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0010-6>.
- Fonseca A and Rodrigues MG. 2011 *Taphrina* Fries (1832). Pp. 1291–1298. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds.) *The Yeasts A Taxonomy Study*. Elsevier. USA. 2354 p.
- Horst RK. 2008. *Westcott's Plant Disease Handbook*. 7th edn. Springer. New York, USA. 295–297. <https://doi.org/10.1108/09504120910925832>.
- Lindsey BE, Rivero L, Calhoun CS, Grotewold E and Brkljacic J. 2017. Standardized Method for High-throughput Sterilization of *Arabidopsis* Seeds. *Journal of Visualized Experiments* 128: 1–7. <https://doi.org/10.3791/56587>.
- Moreno-Rico O, Marmolejo-Monsivais JG, Moreno-Manzano CE and Pérez-Hernández K. 2015. Primer reporte de *Taphrina caerulescens* en encinos (*Quercus* sp.) de la Sierra Fría de Aguascalientes. Congreso Nacional XVI e Internacional de Fitopatología. México. p. 4.
- Nagao H and Katamoto K. 1998. Leaf blister of *Quercus phillyraeoides* caused by *Taphrina caerulescens*. *Mycoscience* 39: 173–178. <https://doi.org/10.1007/bf02464056>.
- Rodrigues MG and Fonseca A. 2003. Molecular systematic of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:607–616. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02437-0>
- Rossi V, Bolognesi M, Languasco L and Giosuè S. 2006. Influence of environmental conditions on infection of peach shoots by *Taphrina deformans*. *Phytopathology* 9: 155–163. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0155>
- Rossi V and Languasco L. 2007. Influence of environmental conditions on spore production and budding in *Taphrina deformans*, the causal agent of peach leaf curl. *Phytopathology* 97: 359–365. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-3-0>
- Taylor J and Birdwell DO. 2000. A scanning electron microscopic study of the Infection of Water Oak (*Quercus nigra*) by *Taphrina caerulescens*. *Mycologia* 92: 309–311. <https://doi.org/10.2307/3761>
- Taylor J and Birdwell DO. 2000. A scanning electron microscopic study of the Infection of Water Oak (*Quercus nigra*) by *Taphrina caerulescens*. *Mycologia* 92: 309–311. <https://doi.org/10.2307/3761566>.
- Valencia S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México* 45: 33–53. <https://doi.org/10.17129/botsoci.1692>.