

First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico

Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México

Miguel Contreras-Pérez, Gustavo Santoyo-Pizano*, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Universidad S/N, Edificio A1', Morelia, Michoacán, C.P. 58030, México. **Sergio de los Santos-Villalobos**, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. **Ma. Angélica Gutiérrez-García, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma. del Carmen Rocha-Granados**, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Uruapan, Michoacán, C.P. 60170, México. *Autor para correspondencia: gsantoyo@umich.mx

Recibido: 16 de Mayo, 2019.

Aceptado: 01 de Julio, 2019.

Contreras-Pérez M, Santoyo-Pizano G, de los Santos-Villalobos S, Gutiérrez-García MA, Orozco-Mosqueda MC and Rocha-Granados MC. 2019. First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 479-485.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-4

Primera publicación DOI: 12 de julio, 2019.

First DOI publication: July 12, 2019.

Resumen. En el año 2017 se presentaron diversos brotes de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de zarzamora variedad "Tupi" (*Rubus* subgénero *Eubatus*) de la región de Los Reyes-Peribán, Michoacán. De las plantas afectadas se realizaron varios cultivos para el aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos. En este trabajo, se caracterizó morfológica y molecularmente la cepa fúngica AB1, mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 18S

Abstract. In 2017, there were several outbreaks of diseases caused by phytopathogenic fungi in blackberry of the "Tupi" variety (*Rubus* subgenus *Eubatus*) crops in Los Reyes-Periban region, Michoacán. Fungal isolates were obtained from symptomatic plants. In this work, the pathogen AB1 was morphological and molecularly characterized. Through BLAST homology searches of the 18S rRNA marker and the rDNA internal transcribed spacer region (ITS), the fungi AB1 had a high identity with fungus of *Lasiodiplodia* genus (*Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva*), additionally, infection of *Lasiodiplodia* sp. AB1 in blackberry plants was corroborated *in vitro*. This is the first report of the isolation of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia* sp. in blackberry crops.

Key words: Infection, Tupi, Stem rot, Molecular characterization.

y la región intergénica (ITS). Los análisis BLAST mostraron que el aislado fúngico AB1 tuvo una alta identidad con hongos del género *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*), adicionalmente se corroboró *in vitro* la infección de *Lasiodiplodia* sp. AB1 en plántulas de zarzamora. Este es el primer reporte de la presencia de *Lasiodiplodia* sp. en cultivos de zarzamora de la variedad "Tupi".

Palabras clave: Infección, Tupi, Pudrición del tallo, caracterización molecular.

El municipio de Los Reyes, Michoacán, México, es el principal productor de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el país, aportando más del 80% de la producción nacional anual, la cual asciende a más de 260 mil toneladas (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). El cultivo de zarzamora es afectado por diversas especies de hongos fitopatógenos, causando pérdidas en la producción y económicas significativas, hasta un 25% equivalente a 2,540 millones de pesos anuales. Entre las principales enfermedades que afectan al cultivo de zarzamora se han reportado el moho gris (*Botrytis cinerea*), la roya anaranjada (*Arthuriomyces peckianus*), la mancha de la hoja (*Cercospora* sp.), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el mildiú (*Peronospora sparsa*), y la pudrición de la raíz (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). Sin embargo, las condiciones edafo-climáticas cambiantes, como consecuencia de las prácticas agrícolas intensivas y el cambio climático, han inducido la aparición de diversos fitopatógenos emergentes con impactos negativos en la producción de cultivos agrícolas de interés económico, social y cultural. Por lo tanto, la correcta identificación y caracterización de dichos fitopatógenos emergentes es importante para proponer estrategias de control eficientes.

The municipality of Los Reyes, Michoacán, Mexico is the main producer of blackberries (*Rubus* subgénero *Eubatus*) in the country, providing over 80% of the national yearly production, which amounts to over 260 thousand tons (SIAP-SAGARPA, 2012-2018). Blackberry production is affected by several species of fungi, causing losses in production, as well as economic losses of up to 25%, equal to 2,540 million pesos per year. Among the main diseases that impact blackberry crops are the gray mould (*Botrytis cinerea*), orange rust (*Arthuriomyces peckianus*), leaf spot (*Cercospora* sp.), anthracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), mildew (*Peronospora sparsa*), and root rot (*Fusarium* sp.) (Fernández-Pavía *et al.*, 2012). However, soil and weather conditions that are changing as a consequence of the intensive agricultural practices and climate change, have exerted an influence on the appearance of diverse emerging phytopathogens with negative impacts on the production of agricultural crops of economic, social and cultural interest. Therefore, the correct identification and characterization of said emerging phytopathogens is important to propose efficient control strategies.

In 2017, blackberry farms located in the municipalities of Los Reyes and Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N and 102° 31' 12.503" W) presented plants in a vegetative state, diseases with leaf, branch and stem necrosis (with a basipetal progression), followed by defoliation and the death of the plant (Figure 1A). These symptoms had not been described by causal pathogens normally reported for blackberry crops, therefore affected plant tissue was gathered, mainly necrotic stems from 5 plants. The samples gathered were kept in humid chambers at 4 °C and later transported to the lab for their immediate analysis in order to identify the biological agent that caused such symptoms. For the isolation of the pathogen, the samples

En 2017, predios comerciales de zarzamora ubicados en los municipios de Los Reyes y Peribán, Michoacán (19° 32' 3.728" N y 102° 31' 12.503" O) mostraron plantas en etapa vegetativa, enfermas con necrosis de hojas, ramas y tallos (con una progresión basipétala), seguido por defoliación y muerte de la planta (Figura 1A). Estos síntomas no habían sido descritos para patógenos comúnmente reportados en el cultivo de zarzamora, por lo que se procedió a la colecta de tejido vegetal afectado, principalmente tallos necróticos de 5 plantas. Las muestras colectadas fueron preservadas en cámaras húmedas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio para su análisis inmediato, con el fin de identificar el agente biológico causal de dichos síntomas. Para el aislamiento del patógeno, las muestras se desinfectaron superficialmente con 3 lavados de cloro al 2% y lavados con agua destilada estéril, posteriormente se trituro el tejido en un mortero estéril. Secciones de 0.5 cm fueron sembradas en cajas de Petri con Agar Dextrosa Papa (PDA), para favorecer el crecimiento de hongos. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 30 °C en obscuridad durante 48 horas. Las colonias fúngicas observadas fueron sembradas bajo las mismas condiciones de cultivo para la purificación de los aislados. Los aislados mostraron un rápido crecimiento micelial (1.5 cm en 6 h) de color blanco (24 h) (Figura 1B), posteriormente tornándose color negro (≥ 48 h) (Figura 1C). Adicionalmente, se realizaron preparaciones, utilizando azul de bromofenol (observadas en un microscopio óptico) para determinar las estructuras de reproducción reportadas para el género *Lasiodiplodia*, tales como: abundante crecimiento micelial conformado por hifas y conidios septados maduros (Figura 1D y 1E), ovoides a elipsoides con contenido granular y ápice redondo (Alves *et al.*, 2008). Un aislado fúngico monospórico, AB1, fue preservado con el código ZPQ1 en la Colección de Microorganismos

were disinfected superficially, washing with 2% chlorine 3 times, and rinsing with sterile distilled water; later, the tissue was grinded in a sterilized mortar. Sections measuring 0.5 cm were planted in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA) to promote fungal growth. The inoculated Petri dishes were incubated at 30 °C in the dark for 48 hours. The fungal isolates observed were cultured under the same growing conditions in order to purify the isolations, which showed a rapid mycelial growth (1.5 cm in 6 h), white in color (24 h) (Figure 1B), and later turning black (≥ 48 h) (Figure 1C). In addition, preparations were carried out, using bromophenol blue (observed under an optic microscope) to determine the reproductive structures reported for the genus *Lasiodiplodia*, such as abundant mycelial growth, composed of mature septated hyphae and conidia (Figure 1D and 1E), ovoidal to elliptical in shape, with a grainy content and an round apex (Alves *et al.*, 2008). A monosporic fungal isolation, AB1, was stored with the code ZPQ1 in the Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

The molecular identification of AB1 began with the extraction of the deoxyribonucleic acid (DNA) from the mycelium of the fungus (1 mg), which was placed in 0.2 mL of TES buffer, mixing the suspension vigorously; next, 5 mg mL⁻¹ of K proteinase were added, along with ammonium acetate, and it was washed with ethanol at 70% and isopropanol in ice. Finally, the residual ethanol was evaporated from the pellet and the DNA was resuspended in deionized water. The quality and concentration of the extracted DNA were verified using an agarose-TAE gel at 1 % and a Thermo Scientific NanoDrop 2000c spectrophotometer. The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene using the universal oligonucleotides

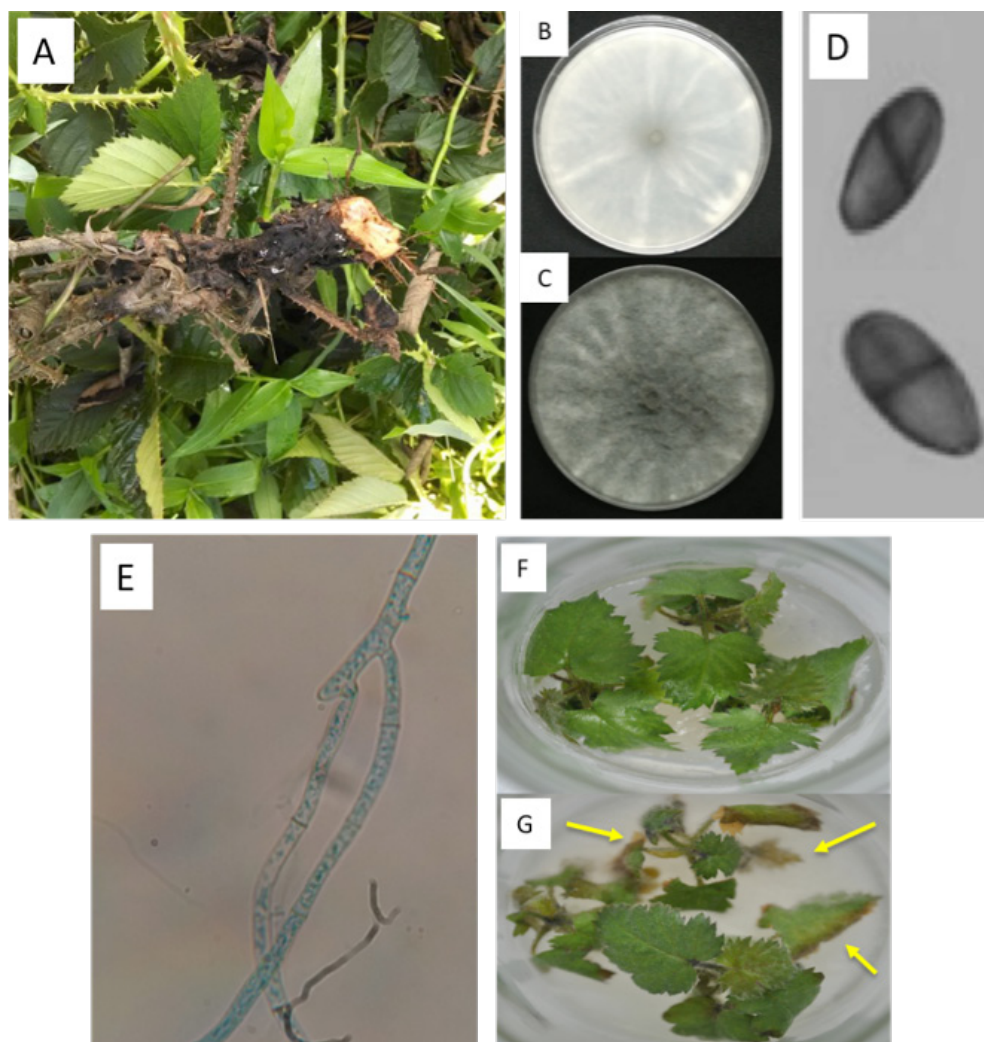


Figura 1. Aislamiento y caracterización morfológica y de infección del fitopatógeno *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Tejido de zarzamora necrosado, material del que se obtuvo el aislamiento de *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) Micelio de *Lasiodiplodia* sp. AB1 a los 5 días de crecimiento. C) Micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1 a los 10 días de crecimiento. D) Conidios maduros. E) Porción del micelio de *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, teñido con azul de bromofenol. F) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' crecida *in vitro*. G) Plántula de zarzamora var. 'Tupi' infectada con *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, las flechas indican zonas necróticas.

Figure 1. Isolation and morphological and infection characterization of the phytopathogen *Lasiodiplodia* sp. AB1. A) Necrotized blackberry tissue, material obtained from the isolation of *Lasiodiplodia* sp. AB1. B) *Lasiodiplodia* sp. AB1 mycelium at 5 days of growth. C) *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium after 10 days of growth. D) Mature conidia. E) Portion of the *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 mycelium, stained with bromophenol blue. F) Blackberry var. 'Tupi' seedling planted *in vitro*. G) Blackberry var. 'Tupi' seedling infected with *Lasiodiplodia* sp., strain AB1; arrows indicate necrotized areas.

Edáficos y Endófitos Nativos-COLMENA (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

Para la identificación molecular de AB1, se partió de la extracción del ácido desoxirribonucleico

NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) and NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA); as well as the intergenic region (ITS) with oligos ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS5

(ADN) a partir del micelio del hongo (1 mg), el cual se colocó en 0.2 mL de buffer TES, mezclando vigorosamente la suspensión; posteriormente se adicionaron 5 mg mL⁻¹ de proteinasa K, acetato de amonio y se realizó el lavado con etanol al 70% e isopropanol en frío. Finalmente, el etanol residual se evaporó de la pastilla y el ADN se resuspendió en agua desionizada. La calidad y concentración del ADN extraído fue verificada mediante un gel de agarosa-TAE al 1% y un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de la marca Thermo Scientific. El ADN fúngico extraído se utilizó para la amplificación del gen 18S RNA ribosomal usando los oligonucleótidos universales NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) y NS8 (TCCGCAGGTTACC-TACGGA); así como, la región intergénica (ITS) con los oligos ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS5 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE al 1%; posteriormente fueron purificados usando el kit The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, para ser secuenciados por una compañía comercial (Macrogen, Korea). Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtener la identidad/afiliación taxonómica del aislado fúngico. La secuencia del gen 18S RNAr del aislado AB1 obtenida fue de 1,050 pares de bases (pb) (No. de acceso NCBI: MG757345.1), dicha secuencia mostró una alta cobertura (100%) y similitud (99.52%) con *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*. La secuencia ITS tuvo una longitud de 539 pb (No. de acceso NCBI: MK841036.1), exhibiendo una identidad del 99.81% con múltiples aislados de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva* (Cuadro 1). *Lasiodiplodia* es un género fúngico que comprende, al menos, 30 especies (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), las cuales han sido asociadas a

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Toju *et al.*, 2012). The resulting amplicons were analyzed by electrophoresis in an agarose-TAE gel at 1% and later purified using the kit The Wizard® SV Gel and Promega PCR Clean-Up System, to then sequenced by a commercial company (Macrogen, Korea). The DNA sequences obtained were analyzed using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to obtain the taxonomic identity/affiliation of the fungal isolate. The sequence of gene 18S RNAr of the isolation AB1 obtained was 1,050 base pairs (bp) (NCBI Access num.: MG757345.1). This sequence displayed a high coverage (100%) and similarity (99.52%) with *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva*. The ITS sequence has a length of 539 bp (NCBI Access num: MK841036.1), displaying an identity of 99.81% with multiple *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia parva* isolations (Table 1). *Lasiodiplodia* is a fungal genus that comprises at least 30 species (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), which have been related to several economically important diseases in agricultural crops, where the causal agent is found as a latent endophyte. Based on the molecular identification of the gene 18S RNAr and the ITS region ADNr, the AB1 isolation has been affiliated to the genus *Lasiodiplodia* sp., until further studies are carried out to classify this isolation at a species level.

In addition, pathogenicity tests were carried out in the isolation AB1 to corroborate its role as a causal agent of the symptoms observed in blackberry plants. To confirm the Koch postulates, an *in vitro* infection test was carried out, in which blackberry seedlings of the “Tupi” variety were micropropagated, placing three plants per jar, which were then inoculated 1x10⁶ spores of the isolation AB1 (control plants were sprayed with sterile distilled water). The plants were incubated for 5 days in a Percival AR66L growth chamber at a

Cuadro 1. Identidad máxima encontrada de las secuencias ribosomales 18S e ITS de la cepa AB1 en el GenBank.
Table 1. Maximum identity found for sequences 18S and ITS of strain AB1 in the GenBank.

Especie/Cepa	Máxima identidad por 18S RNAr (ID GenBank)	Máxima identidad por ITS (ID GenBank)
<i>Lasiodiplodia</i> sp. AB1	99.52% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (NG_062745.1)	99.81% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MK530050.1)
	99.52% <i>Lasiodiplodia parva</i> (GQ469913.1)	99.81% <i>Lasiodiplodia parva</i> (KX227559.1)

diversas enfermedades de cultivos agrícolas de importancia económica, en donde dicho agente causal se encuentra como un endófito latente. Con base en la identificación molecular del gen 18S RNAr y la región ITS ADNr, el aislado AB1 ha sido afiliado al género *Lasiodiplodia* sp., hasta realizar más estudios para clasificar este aislado a nivel de especie.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de patogenicidad del aislado AB1 para corroborar su papel como agente causal de los síntomas observados en las plantas de zarzamora. Para confirmar los postulados de Koch, se realizó un ensayo de infección *in vitro*, en el cual, se micropropagaron plántulas de zarzamora de la variedad “Tupi”, colocando tres plantas por frasco, a las que posteriormente se les inocularon 1×10^6 esporas del aislado AB1 (plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril). Las plantas se incubaron por 5 días en una cámara de crecimiento Percival AR66L, bajo una temperatura constante de 22 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Posterior al tiempo de inoculación del aislado AB1, todas las plantas inoculadas mostraron síntomas similares a los observados en los predios comerciales, clorosis, así como zonas con necrosis en hoja y tallo. Además, la cepa AB1 fue re-aislada y caracterizada de dichas plantas sintomáticas. Lo anterior demuestra

constant temperature of 22 °C and a light period of 16 hours and 8 hours of darkness. After the time of inoculation of isolation AB1, all inoculated plants displayed similar symptoms to those observed in commercial farms, chlorosis, as well as areas with leaf and stem necrosis. Also, strain AB1 was re-isolated and characterized from the symptomatic plants. This shows that *Lasiodiplodia* sp., strain AB1 has the ability to infect blackberry var. “Tupi” plants, the crop it was isolated from (Figures 1F and 1G). Additional studies are in process to determine the pathogenicity in older plants in greenhouses and its biocontrol with antagonistic bacteria.

In conclusion, based on morphological observations, the molecular characterizations and the compliance with the Koch postulates, it was possible to identify, for the first time in Mexico – as far as we know – according to the revision of technical literature, that the isolation AB1 belongs to the genus *Lasiodiplodia*, and is the causal agent of the symptoms observed in blackberry plants in commercial farms located in the municipality of Los Reyes, Michoacán. This information will provide important information for the integrated management of this disease, in order to avoid possible epidemiological outbreaks in the crop, and economic losses.

que *Lasiodiplodia* sp., cepa AB1, tiene la capacidad de infectar plantas de zarzamora var. "Tupi", cultivo del que fue aislado (Figura 1F y 1G). Estudios adicionales están en proceso para determinar la patogenicidad en plantas de mayor edad en invernadero y su biocontrol con bacterias antagonistas.

En conclusión, con base en observaciones morfológicas, la caracterización molecular y el cumplimiento de los postulados de Koch, se identificó por primera vez en México -hasta donde sabemos-, según la revisión de literatura técnica, que el aislado AB1 perteneciente al género *Lasiodiplodia* es el agente causal de los síntomas observados en plantas de zarzamora en predios comerciales ubicados en el municipio de Los Reyes, Michoacán. Dicha identificación proveerá información de importancia para el manejo integrado de esta enfermedad, con el fin de evitar posibles brotes epidemiológicos en el cultivo y pérdidas económicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana por el apoyo a nuestros proyectos de investigación (2018-2019).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Coordination of Scientific Research of the Universidad Michoacana for the support provided to our research projects (2018-2019).

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

#### LITERATURA CITADA

- Alves A, Crows PW, Correia A and Philips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón B y Estrada-Mora JC. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9: 191-202. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado GR, Gómez-Dorantes N, Gregorio-Cipriano MR y Fernández-Pavía YL. 2012. Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. Biológicas, 14(2): 75-89. <https://biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=140&path%5B%5D=139>
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. Fungal Biology. 121:452-465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S and Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. PloS one 7(7): e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- SIAP-SAGARPA (2012-2018). Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca. (Consultado en 2019) [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)