

Pathogenic fungi associated to commercial seed of mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*

Hongos patogénicos asociados a semilla comercial de variedades mexicanas de *Bouteloua curtipendula*

Adrián Raymundo Quero-Carrillo, Alicia Zárate-Ramos, ¹Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, CP 56230; Leticia Robles-Yerena, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SENASICA, Km 37.5 Carretera México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 55740; Cristián Nava-Díaz¹, Leonor Miranda-Jiménez*¹, Sergio González-Muñoz¹, *Autor para correspondencia: lmirandaj@colpos.mx

Recibido: 06 de Febrero, 2020.

Aceptado: 18 de Abril, 2020.

Quero-Carrillo AR, Zárate-Ramos A, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Miranda-Jiménez L and González-Muñoz S. 2020. Pathogenic fungi associated to commercial seed of mexican varieties of *Bouteloua curtipendula*. Mexican Journal of Phytopathology 38(2): 198-214.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2002-4

Primera publicación DOI: 01 de Mayo, 2020.

First DOI publication: May 01, 2020.

Resumen. La semilla es una importante forma de diseminación de patógenos; para determinar aquellos asociados a semilla comercial de variedades de pasto Banderita: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith, NdeM-La resolana, se analizaron tres tipos de propágulo: espiguillas completas (cariópside + brácteas accesorias; M₁), cariópside únicamente con lemas (M₂) y cariópsides limpios (M₃), provenientes de lotes del Valle del Mezquital, Hidalgo, cosechados en 2017. Para promover el desarrollo de hongos, se sembraron espiguillas (M₁) en cámara de humedad; mientras

Abstract. Plant seeds represent a main source for pathogen dissemination; in order to determine pathogens associated with propagules of five varieties of sideoats gramma: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith, NdeM-La resolana, three different kind of propagules were analyzed, from seed (spikelets) available from commercial production fields located at Valle del Mezquital, Hidalgo: spikelets (caryopsis + accessory bracts; M₁), caryopsis + lemma (M₂) and pure caryopsis (M₃). Seed was harvested during 2017. In order to promote the expression of fungus growth already present on the propagule, spikelets (M₁) were sown within a humidity chamber; while M₂ and M₃, sown on PDA culture media (five propagules per Petri dish, 60 dishes per variety); growth material was later sown on specific media for identification. Isolated results were identified through growth traits on culture media, morphology traits and molecular markers. *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* was observed for 67% of the samples, *Fusarium scirpi* and *F. incarnatum*, at 24%, and *Bipolaris cynodontis*, in

que M₂ y M₃ fueron sembradas en medio PDA (cinco propágulos por caja Petri y 60 cajas por variedad); posteriormente, los crecimientos se aislaron en medios selectivos. Los aislados se identificaron por características del cultivo, morfológicas y moleculares. Se obtuvieron 51 aislamientos en los tres tipos de propágulo y variedades; los cuales, se asociaron a *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* (67% de frecuencia), *Fusarium scirpi* y *F. incarnatum* (24%) y *Bipolaris cynodontis* (9%). Ninguna de estas especies ha sido reportada anteriormente en México para semilla comercial de *B. curtipendula*. Con lo anterior, se abre un panorama de opciones para futuros estudios de patogenicidad de los hongos aislados y en consecuencia el manejo sanitario de la semilla producida.

Palabras clave: Banderita, calidad de semilla, sanidad de semilla.

La semilla es el vehículo (sexual y asexual), por excelencia, para la propagación de cultivos; lo anterior, como portadoras de características genéticas y morfológicas destacadas para la producción agropecuaria; sin embargo, pueden transportar organismos patógenos, lo que afecta la eficiencia productiva (Arriagada, 2012; Lamichhane *et al.*, 2020). El efecto negativo de la asociación patógeno-semilla puede limitar la densidad de plantas, materia prima, alimentos y afectar seriamente tanto la salud humana y animal (Afzal *et al.*, 2019). La inspección y análisis de semilla permite la detección oportuna de los patógenos asociados y con ello, la oportunidad de tomar medidas de manejo. Entre los patógenos asociados a semillas forrajeras, los hongos poseen mayor importancia; lo anterior, dado que, además de afectar la densidad vegetal al establecimiento, rendimiento por enfermedades, también provocan alteraciones en parámetros de calidad de la cosecha:

9%. To date, none of these pathogenic species have been reported in Mexico for commercial seed of *B. curtipendula*. These findings open a wide spectrum for sanitary management of produced seed for this plant species.

Key words: sideoats gramma, seed health, seed quality.

Seed is the major form (sexual and asexual) of crop dissemination. Seeds carry genetic and morphological traits that are essential for livestock and agricultural production. However, seeds can also carry pathogenic organisms, which can affect production efficiency (Arriagada, 2012; Lamichhane *et al.*, 2020). The negative effect of the seed-pathogen association can limit plant density, raw materials, food, and seriously affect both human and animal health (Afzal *et al.*, 2019). Seed inspection and analysis allow the timely detection of the causal pathogens thus providing the opportunity to take management measures. Among the pathogens associated with seed of fodder grass species, fungi are the most important because, in addition to affecting plant density at establishment and yield due to diseases, they also alter crop parameters, including stem lignification, lower digestibility, free amino acid content in roots and leaves of the affected plants, mycotoxins that cause livestock diseases, among other problems (Pirelli *et al.*, 2016). Plant health along with other variables (viability, germination, purity and vigor) determine the quality of a seed lot. Most of the specialized literature indicates that fungi genera such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Pestalotia* and *Rhizopus*, include species associated with

lignificación de tallos, disminución de digestibilidad, contenido de aminoácidos libres en raíz y hojas de plantas afectadas, micotoxinas causantes de enfermedades en el ganado, entre otros problemas (Pirelli *et al.*, 2016). La fitosanidad junto con otras variables (viabilidad, germinación, pureza y vigor) determinan la calidad de un lote de semilla. La mayor parte de la literatura especializada indica que géneros de hongos como: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Pestalotia* y *Rhizopus*, incluyen especies asociadas a la semilla, en campo y almacén (Lezcano *et al.*, 2007). Los beneficios de una semilla con buen control sanitario contra patógenos aéreos y del suelo incluyen mejor emergencia, altura y vigor de planta; además, mayor biomasa aérea y radical de esta (Lamichhane *et al.*, 2020).

En México, cerca del 90% de las semillas forrajeras son importadas (Quero *et al.*, 2017). La necesidad de recursos genéticos forrajeros nacionales que garanticen calidad, alta persistencia y adaptación a condiciones regionales específicas (Quero *et al.*, 2007) hace necesarios estudios de calidad de semilla producida en el país; lo anterior, con el fin de otorgarle calidad sanitaria en conjunto con la calidad genética y comercial y promover la recuperación del mercado nacional con semilla de la mejor calidad. El establecimiento de praderas de alto riesgo en temporal semiárido implica su manejo con elevada incertidumbre inherente al clima y donde la calidad biológica y sanitaria de semilla es, las más de las veces, el único componente que se puede manejar con certidumbre (Quero-Carrillo *et al.*, 2014). Pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* es una especie nativa de México árido y semiárido, con buena apetencia para el ganado, alta calidad nutricional y ampliamente demandado en resiembras de praderas y pastizales de zonas áridas y semiáridas

seed, in the field and in the warehouse (Lezcano *et al.*, 2007). The benefits of seed with good sanitary control against airborne and soil pathogens include better emergence, plant height and vigor, as well as greater aerial and root biomass (Lamichhane *et al.*, 2020).

In Mexico, nearly 90% of fodder grass species seeds is imported (Quero *et al.*, 2017). The need for national genetic resources for forage species that guarantee quality, high persistence and adaptation to specific regional conditions (Quero *et al.*, 2007), makes it necessary to conduct studies on seed produced in Mexico to assure sanitary, genetic and commercial quality, and to promote the recovery of the national market with seed of best quality. The establishment of high-risk prairies under semiarid rainfed areas implies management with high uncertainty due to the climate and where the biological and sanitary quality of seed is, most of the time, the only component that can be managed with certainty (Quero-Carrillo *et al.*, 2014). Sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) is a species native to Mexico's arid and semiarid areas showing good palatability for grazing cattle, has high nutritional quality and is in high demand for reseeding prairies and pasturelands in arid and semiarid areas (Morales *et al.*, 2009). Therefore, the objective of the present study was to identify pathogenic fungi associated with sideoats gramma seed that is commercially produced in Valle del Mezquital, Hidalgo.

MATERIALS AND METHODS

Genetic material. The evaluated varieties correspond to five apomictic genetic materials of sideoats gramma registered by Colegio de Postgraduados in 2017 and 2018, available for research at the Forages area of the Livestock

(Morales *et al.*, 2009). Por consiguiente, objetivo del presente trabajo fue identificar hongos patógenos asociados a las semillas del pasto Banderita producida comercialmente en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético. Las muestras evaluadas pertenecen a cinco materiales genéticos apomícticos de pasto Banderita, registrados por el Colegio de Postgraduados, durante 2017 y 2018, disponibles para investigación en el área de Forrajes del Programa de Ganadería. Se evaluaron las variedades noveles, de las cuales, se carece de información sobre su calidad sanitaria: 1) “NdeM-La Zarca”, 2) “NdeM-303”, 3) “NdeM-5”, 4) “NdeM-Zenith” y 5) “NdeM-La Resolana”. La semilla se cosechó al centro de praderas exclusivas para producción comercial de semilla, regadas con aguas del río Tula, libres de pastoreo, en áreas con, al menos, un año de establecidas y con superficies de una (NdeM-5, NdeM-Zenith; NdeM-La Resolana) y 10 ha (NdeM-La Zarca, NdeM-303), localizadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo y cosechada manualmente en otoño de 2017. Este valle se localiza a 2000 msnm delimitado por sierras al norte y noreste, que impiden el paso de masas de aire húmedo provenientes del Golfo de México. El clima es seco con lluvias en verano clasificado como tipo BSkwg y BShwg. Precipitación anual entre 500 y 600 mm. Temperaturas mínima de -10 °C en invierno y máxima de 39.5 °C, en verano (CONAGUA, 2018).

Aislamiento y purificación de hongos. El trabajo fue realizado en el Departamento de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo-Texcoco, Estado de México, durante el 2018. Las semillas de cada variedad se

Program. These novel varieties were evaluated for which information about their sanitary quality is not available: 1) “NdeM-La Zarca”; 2) “NdeM-303”; 3) “NdeM-5”; 4) “NdeM-Zenith”; and 5) “NdeM-La Resolana”. The seed was manually harvested (Autumn, 2017) in the middle of plots that are used only for commercial seed production and are irrigated with water from the Tula River, where no cattle are grazed, in sites that were established at least one year ago, with surfaces of one (NdeM-5, NdeM-Zenith; NdeM-La Resolana) and 10 ha (NdeM-La Zarca, NdeM-303), located in Valle del Mezquital, Hidalgo. Valle del Mezquital is located at 2000 masl and surrounded by northern and northeastern mountain ranges that keep humid air masses from the Gulf of Mexico from entering the valley. The weather is dry with summer rains classified as BSkwg and BShwg type. Annual rainfall is 500-600 mm. The minimum temperature is -10 °C in winter and the maximum 39.5 °C in summer (CONAGUA, 2018).

Fungi isolation and purification. The study was conducted in the Phytosanitary-Phytopathology Department of Colegio de Postgraduados, Montecillo-Texcoco *Campus*, State of Mexico, in 2018. The seeds of each variety were separated into three types of samples or propagules: M_1 -spikelets (accessory bracts + caryopses), M_2 -caryopsis with lemmas and clean M_3 -caryopsis (without accessory bracts). Each type of propagule (M_1 , M_2 y M_3) and variety was placed in 60 Petri dishes. The isolates were obtained: M_1 , not disinfested, using the blotting paper and freezing method (Warham *et al.*, 1998). M_2 and M_3 were disinfested in a 1.5% sodium hypochlorite solution for 2 min, rinsed three times with sterile distilled water, dried with sterile absorbent paper, and five propagules per Petri dish were sown in Bioxon® PDA culture medium (potato-dextrose-agar; Crous *et al.*, 2009).

separaron en tres tipos de muestra o propágulo: M₁-espiguillas (brácteas accesorias + cariósides), M₂-cariósides con lemas y M₃-cariósides limpios (sin brácteas accesorias). Se sembraron 60 cajas Petri de cada tipo de propágulo (M₁, M₂ y M₃) y variedad. Los aislamientos se obtuvieron: M₁, sin desinfectar por el método de papel secante y congelación (Warham *et al.*, 1998). En el caso de M₂ y M₃, fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio a 1.5% por dos min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron cinco propágu- los por caja Petri en medio de cultivo PDA (papa- dextrosa-agar; Crous *et al.*, 2009) marca Bioxon®. Las cajas se incubaron a 24 ± 2 °C por ocho días o hasta el desarrollo de estructuras. Posteriormente, se realizaron los sub-cultivos necesarios en medio de cultivo PDA, con el fin de iniciar el proceso de purificación con la técnica de punta de hifa y monospóricos (Gilchrist *et al.*, 2005). Para calcular la frecuencia de aislamiento por género y tipo de muestra se utilizó la siguiente ecuación: Frecuencia (%) = (No. de aislados del género identificado / total de aislados analizados por tipo de muestra) * 100 (Mariscal *et al.*, 2017).

Caracterización morfológica. De los aislamientos obtenidos, posteriormente se sembraron en medios selectivos de cultivo, de acuerdo a los posibles gé- neros obtenidos de las siembras. Los aislamientos del género *Alternaria* se sembraron en cajas Pe- tri con medio de cultivo PDA, V₈ (Agar-jugo de verduras®) y PCA (Papa-Zanahoria-Agar); los del género *Fusarium* en medio PDA, CLA (Agar- clavel) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer-Agar); y finalmente, los del género *Bipolaris* solo en me- dio PDA. Las cajas se incubaron a temperatura de 24 ± 2 °C con 12 horas luz/oscuridad, durante 14 días. Para la identificación morfológica se realizó con base a color de colonia, forma y tamaño de

The Petri dishes were incubated at 24 ± 2 °C for 8 days or until structures were formed. Later, the necessary sub-cultivations were performed in PDA culture medium in order to proceed with the purification process using the hyphal tip and monosporic technique (Gilchrist *et al.*, 2005). The following equation was used to calculate the isolation frequency per genus and type of sample: Frequency (%) = (Number of isolates of the identified genus/total of isolates analyzed by type of sample) * 100 (Mariscal *et al.*, 2017).

Morphological characterization. The obtained isolates were then sown in selective culture media according to the possible genera obtained by sowing the propagules. The *Alternaria* genus isolates were sown in petri dishes with PDA culture medium, V₈ (Agar-vegetable juice®) and PCA (Potato-Carrot- Agar); the isolates of the *Fusarium* genus were sown in PDA culture medium, CLA (Carnation Agar) and SNA (Spezieller Nährstoffarmer-Agar); and, finally, isolates of the *Bipolaris* genus were sown in PDA culture medium only. The Petri dishes were incubated at 24 ± 2 °C temperature with 12 cycles of light/darkness for 14 days. Morphological identification was done based on the color of the colony, and the shape and size of the conidiophores and conidia. For *Fusarium* and *Bipolaris*, semi-permanent preparations were made in 50% glycerol. The sample size used for these measurements consisted of 50 specimens per genus (Crous *et al.*, 2009) that were documented using a compound microscope with a Motic Images Plus 2.0 camera (Software Motic 580 ver.5.0.) and a Carl Zeiss® Imager D2 microscope with a camera (Axioncam 503 color). Identification was made based on taxonomic keys (Warham *et al.*, 1998; Barnett and Hunter, 1972; Gilchrist *et al.*, 2005; Leslie and Summerell, 2006; Manamgoda *et al.*, 2014).

conidióforos y conidios; para *Fusarium* y *Bipolaris*, se llevaron a cabo preparaciones semipermanentes en glicerol al 50%. El tamaño de muestra para las mediciones fue de 50 ejemplares por cada género (Crous *et al.*, 2009), documentadas con ayuda de microscopio compuesto con cámara Motic Images Plus 2.0, (Software Motic 580 ver.5.0.) y microscopio Carl Zeiss® Imager D2 con cámara (Axioncam 503 color). La identificación se realizó con base a claves taxonómicas (Warham *et al.*, 1998; Barnett y Hunter, 1972; Gilchrist *et al.*, 2005; Leslie y Summerell, 2006; Manamgoda *et al.*, 2014).

Identificación molecular, alineamiento de secuencias y análisis filogenético. Para confirmar molecularmente las especies de hongos se realizó la extracción de ADN genómico por el método de Fosfatasa Alcalina (AP) (Sambrook y Russell, 2001) y se corroboró su calidad por medio del Nanodrop; posteriormente, se enviaron a Macrogen® Inc., Korea para la purificación y amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se amplificó la región ITS del ADN ribosomal ITS4 con la utilización del iniciador: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', para *Alternaria* spp. y *Bipolaris* spp., cuyo fragmento de amplificación es de 550 bp (White *et al.*, 1990); mientras que para *Fusarium* spp., se realizó en el ADN ribosomal ITS4 con el iniciador EF1-983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'; Kidd *et al.*, 2019), con un producto de 900 a 1,200 bp. Ambos iniciadores se consideran universales de dominio público. Las secuencias se editaron y alinearon manualmente mediante el Software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) y se compararon individualmente en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology (NCBI) USA, mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con los parámetros preestablecidos.

Molecular identification, sequence alignment and phylogenetic analysis. To molecularly confirm the fungal species, genomic DNA was extracted using the alkaline phosphatase method (AP) (Sambrook and Russell, 2001) and its quality was evaluated using a Nanodrop. Then, samples were sent to Macrogen® Inc., Korea, for purification and DNA amplification through polymerase chain reaction (PCR). To do this, the ITS region of the ITS4 ribosomal DNA was amplified using the primer 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' for *Alternaria* spp. and *Bipolaris* spp., which amplified a 550 bp fragment (White *et al.*, 1990). For *Fusarium* spp., the ITS4 ribosomal DNA was used with the primer EF1-983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'; Kidd *et al.*, 2019) which amplified a 900-1,200 bp fragment. Both primers are considered universal and in the public domain. The sequences were edited and manually aligned with the BioEdit 7.2.5 software (Hall, 1999), and individually compared in the Gene Bank of the National Center for Biotechnology (NCBI), USA, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program with the pre-established parameters. The phylogenetic analysis of the multiple sequences was done using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) software and the reference sequences reported by Woudenberg *et al.* (2013) for the genus *Alternaria*; by O'Donnell *et al.* (2009) for *Fusarium*, and by Manamgoda *et al.* 2014 for *Bipolaris*. All the sequences were aligned with the CLUSTAL-W algorithm and analyzed using the Neighbor-joining method (NJ) (Saitou and Nei, 1987). One thousand (1000) replications of support values (Bootstrap) were used to obtain a consensus tree with 70% majority rule (Tamura *et al.*, 2004). The *Phakopsora vitis* basidiomycete was used as a root node, external to the group.

Para el análisis filogenético de las secuencias múltiples se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) y las secuencias de referencia reportadas por Woudenberg *et al.* (2013), para el género *Alternaria*; de O'Donnell *et al.* (2009), para *Fusarium* y para *Bipolaris*, de Manamgoda *et al.* (2014). Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL-W y se analizaron con el método Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Se utilizaron 1000 réplicas de valores soporte (Bootstrap) para obtener un árbol consenso con una regla de mayoría del 70% (Tamura *et al.*, 2004). Se utilizó al basidiomiceto *Phakopsora vitis* como nodo raíz, externo al grupo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las 900 siembras que se realizaron para cada variedad (300 por tipo de propágulo), los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*, fueron los principales hongos aislados en propágulos de pasto Banderita, con incidencia variable, dependiendo del tipo de propágulo y variedad. El género *Alternaria* con 67% fue el que se identificó con mayor frecuencia entre las cinco variedades y los tres tipos de propágulo; lo anterior, con excepción de M₃ (cariópside limpio) de la variedad NdeM-5, donde no se aisló este género como resultado de la protección física que las brácteas accesorias proporcionan en esta especie, retrasando o evitando la entrada del patógeno. En alguna parte del desarrollo de semilla, las brácteas (glumas, lema y palea) son suficientemente sólidas o impermeables para evitar la llegada del patógeno al cariópside. Este hongo posee amplia distribución y presencia en el ambiente y puede infestar, desde el suelo, a semillas antes y después de la cosecha (Pavón *et al.*, 2012); similarmente, por contacto con brácteas contaminadas y/o mal manejo de cosecha de semilla; lo anterior, es

RESULTS AND DISCUSSION

Among the 900 sowings of each variety (300 per type of propagule), the genera *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* were the main fungi isolated from sideoats gramma propagules with variable incidence, depending on the type of propagule and variety. The *Alternaria* genus was identified with the greatest frequency (67%) among the five varieties and the three types of propagule, except for M₃ (clean caryopse) of the NdeM-5 variety, from which this genus was not isolated because of the physical protection provided by the accessory bracts of this species, which delay or prevent pathogen penetration. At some stage of seed development, the bracts (glumes, lemma and palea) are solid and impermeable enough to keep the pathogen from reaching the caryopse. This fungus is widely distributed and present in the environment and can, from the soil, infest the seeds before and after harvest (Pavón *et al.*, 2012). The seed can also be infested by coming in contact with contaminated bracts and/or because of poor seed management. This is important for seedling survival after sowing and not necessarily for fodder quality in perennial species such as sideoats gramma.

The *Fusarium* genus had 24% incidence and was found in the five varieties, with variable frequency among them; the fungus was isolated most frequently from M₂ and M₃, which indicates that the benefit to the caryopse improves the propagule's health. The presence of *Fusarium* can be caused by its biological cycles, since, in areas with low environmental moisture, for example, the arid regions where sideoats gramma grows naturally, the infection is almost exclusively produced by the inoculum present in the soil, which invades and penetrates the stems and root base; for this reason, the chemical or biological protective agents added to the seed avoid seedling infestation, either from

importante para la sobrevivencia de plántulas post-siembra y no necesariamente para la calidad de forraje en especies perennes como pasto Banderita.

El género *Fusarium* presentó una incidencia de 24% (número) y, estuvo presente en las cinco variedades con frecuencia variable entre variedades, siendo en M₂ y M₃ donde se aisló con mayor frecuencia; lo cual, es indicativo de que el beneficio al cariósido mejora la sanidad del propágulo. La presencia de *Fusarium* puede deberse a su ciclo biológico ya que, en zonas con baja humedad ambiental, como son las regiones áridas donde se desarrolla naturalmente pasto Banderita, la infección la causa casi de manera exclusiva el inóculo presente en suelo, invadiendo y penetrando la base de tallos y raíces, por lo que los agentes protectores químicos o biológicos adicionados a la semilla evitan la infestación de plántulas, ya sea desde las brácteas accesorias o desde el suelo (Cook, 2010), llegando infectar a toda la planta. Finalmente, el género *Bipolaris*, con 9% de incidencia, fue el de menor número de aislados en las cinco variedades, siendo en M₃ de NdeM-La Zarca donde se presentó en mayor frecuencia (Figura 1). Los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* están asociados a enfermedades de hoja, tallo y raíz en gramíneas, así como con la producción de micotoxinas con efectos negativos en la salud animal (Sainz *et al.*, 2012). Enfermedades como “Damping-off” y punta negra del grano, pueden ser causadas por el complejo *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Bipolaris* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

Identificación morfológica. Aunque no se observaron síntomas en la semilla, la presencia de hongos que afecten el desarrollo de plántulas, es importante a la siembra, ya que definirá la capacidad competitiva de estas ante un ambiente naturalmente desafiante, así como su densidad en la pradera. Se obtuvieron 51 aislamientos de los tres

the accessory bracts or from the soil (Cook, 2010) and infect the whole plant. Finally, the *Bipolaris* genus, with 9% incidence, had the lowest number of isolates in the five varieties, of which NdeM-La Zarca in M₃ had the greatest frequency (Figure 1). The *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera are associated with leaf, stem and root diseases in grain crops, as well as the production of mycotoxins that negatively affect animal health (Sainz *et al.*, 2012). Diseases like Damping-off and grain black point can be caused by *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. and *Bipolaris* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

Morphological identification. Although no symptoms were observed on the seed, the presence of fungi that affect seedling development is important during sowing, since it will define the seedlings' competitive capacity in a naturally challenging environment as well as their density in the prairie. Fifty-one (51) isolates of the three types of sample (M₁, M₂, M₃) were obtained and five morphospecies were identified: *Alternaria* F and *Alternaria*-cl, *Bipolaris*-os, *Fusarium* 1 and *Fusarium* 2. Based on the taxonomic keys for each genus, the following species were identified: *Alternaria*-cl: colony gray in color in PCA culture medium, with rough-dotted ornamentation, obclavate, wall-like conidia, transversal septation of 1-6 and longitudinal septation with 0-3 septa, conidia size 15-34 x 6.3-13.5 µm, and primary conidiophores 12-46 x 3.8-5.4 µm in size. The catenulation can have 5-15 conidia, has secondary ramification, characteristics which, according to Simmons' keys (1995), correspond to *A. tenuissima* (Figure 2A-2C). *Alternaria* F: colony gray-olive in color in PCA culture medium, obclavate, wall-like conidia with rough-dotted ornamentation, transversal septation of 1-6 and longitudinal septation of 0-3, conidia size 10.5-42 x 6.4-12.7 µm, and primary conidiophores 34.1- 44.8

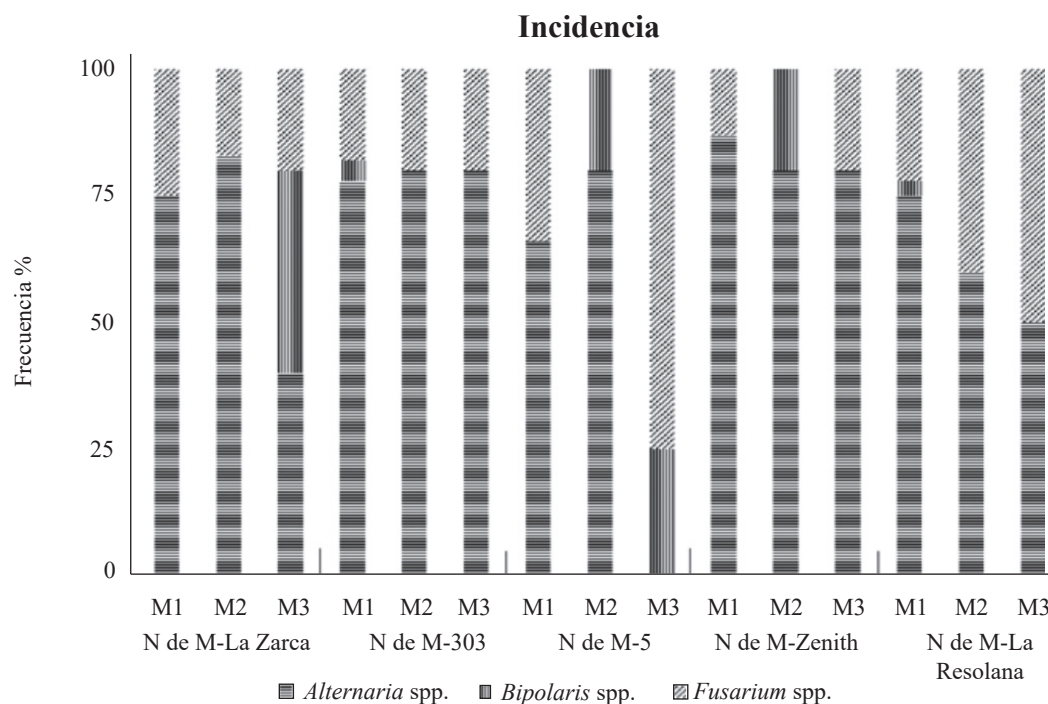


Figura 1. Frecuencia de los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* aislados de cinco variedades comerciales del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) a partir de espiguillas, cariósides con lemas y cariósides limpios. M1: espiguilla completa; M2: cariósido con lema; M3: cariósido limpio.

Figure 1. Frequency of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera isolates of five commercial varieties of sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) from spikelets, caryopses with lemmas and clean caryopses. M1: full spikelet; M2: caryopses with lemma; M3: clean caryopse.

tipos de muestra (M_1 , M_2 , M_3); entre los cuales, se identificaron cinco morfoespecies: *Alternaria* F y *Alternaria*-cl, *Bipolaris*-os, *Fusarium* 1 y *Fusarium* 2. De acuerdo con las claves taxonómicas para cada género, se identificaron las siguientes especies: *Alternaria*-cl: colonia de coloración gris en medio de cultivo PCA, conidios con ornamentación rugosa-punteada, obclavados, muriformes, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3 septas, tamaño de conidios de 15-34 x 6.3-13.5 μm , conidióforos primarios de 12-46 x 3.8-5.4 μm . La catenulación puede poseer de 5-15 conidios, presenta ramificación secundaria, correspondiendo estas características a *A. tenuissima* de acuerdo a las claves de Simmons (1995) (Figura 2A-2C). *Alternaria* F: colonia grisáceo-olivo en medio PCA,

x 3.1- 4.6 μm in size. The catenulation can have 5-10 conidia, abundant secondary ramification, which are characteristics that correspond to *A. alternata* (Simmons, 1995) (Figure 2D-2F). In this species, spores survive on the seed or in the mycelium inside the seed, and high humidity and temperatures of 20-25 °C favor their development. The *A. alternata* fungus has been isolated from wheat seeds (Bautista *et al.*, 2011), and Leucaena (Lezcano *et al.*, 2010); it causes leaf blight on oats (García *et al.*, 2013), rot in fruit trees (Mariscal *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017) and vegetables (Fraire *et al.*, 2010). The effect of many fungi on perennial grasses can be pathogenic (Kononenko *et al.*, 2015; Masi *et al.*, 2017) and/or reinforce their resistance to diverse environmental pressures (Ali *et al.*,

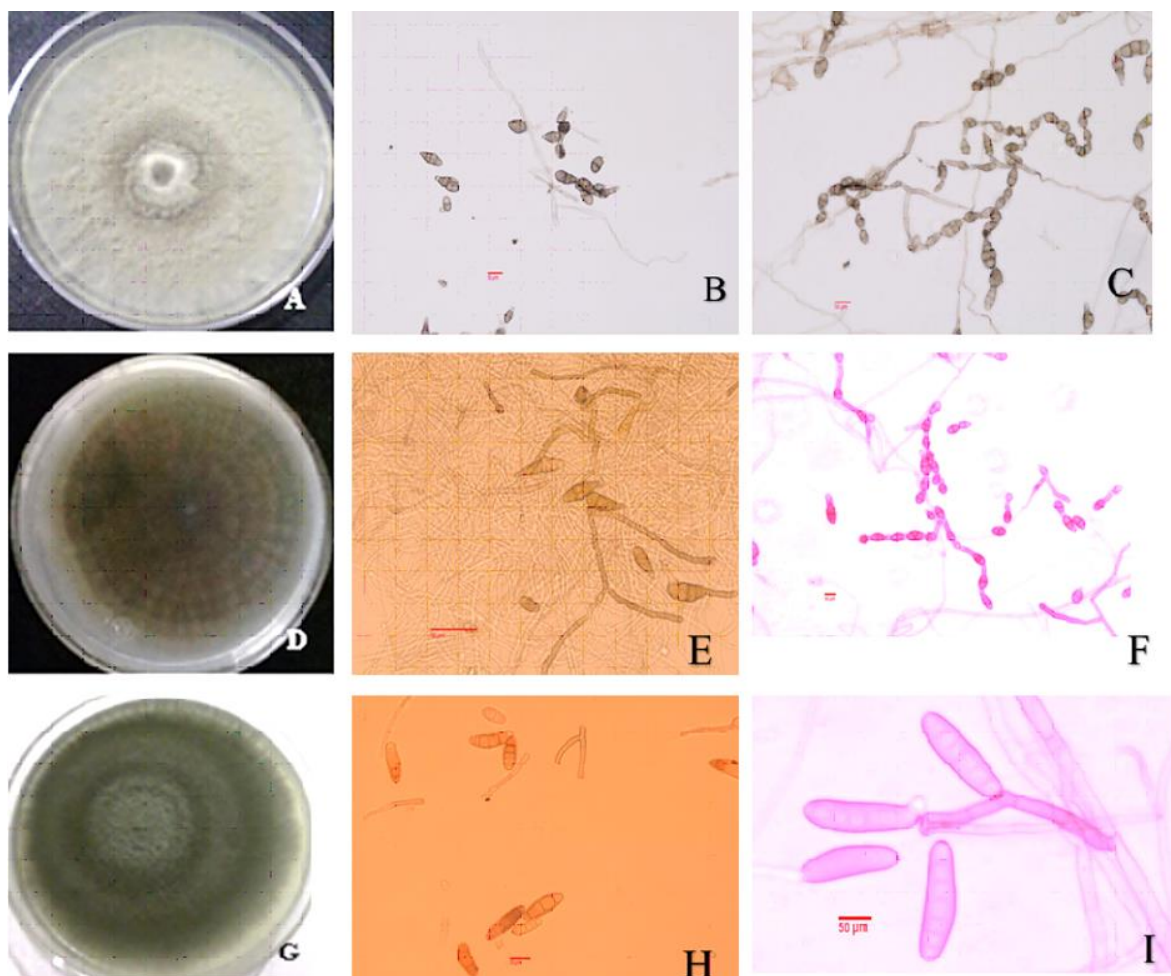


Figura 2. Características culturales y morfológicas de hongos asociados a semilla de pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. Morfología de los hongos. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colonia en PCA, B) Conidios, C) Cadena de conidios. D-F) *Alternaria alternata*, D) Colonia en PCA, E) Conidios, F) Cadena de conidios. G-I) *Bipolaris cyndontis*, G) Colonia en PDA, H) Conidios, I) Conidióforo.

Figure 2. Figure 2. Cultural and morphological characteristics of fungi associated with seed of sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo. Fungi morphology. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colony on PCA, B) Conidia, C) Conidia chain. D-F) *Alternaria tenuissima*, A) Colony on PCA, B) Conidia, F) Conidia chain. G-I) *Bipolaris cyndontis*, G) Colony on PDA, H) Conidia, I) Conidiophore.

conidios obclavados, muriformes con ornamentación rugosa-punteada, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3, tamaño variable de conidios de 10.5-42 x 6.4-12.7 μm , conidióforos primarios de 34.1- 44.8 x 3.1- 4.6 μm . La catenulación puede poseer de 5-10 conidios, presenta abundante

2017). *Alternaria tenuissinna* is present in wheat crops (Perello *et al.*, 2015). These species produce mycotoxins that can be present in products such as flour, concentrates and processed foods, and can seriously affect human and animal health (Pavón *et al.*, 2012).

ramificación secundaria, correspondiendo estas características a *A. alternata* (Simmons, 1995) (Figura 2D-2F); en esta especie, las esporas sobreviven sobre la semilla o el micelio dentro de esta, la alta humedad y temperaturas de 20-25 °C favorecen su desarrollo. El hongo *A. alternata* ha sido aislada de semillas de trigo (Bautista *et al.*, 2011) y Leucaena (Lezcano *et al.*, 2010), en avena causa tizón foliar (García *et al.*, 2013), pudriciones en frutales (Mariscal *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017) y hortalizas (Fraire *et al.*, 2010). El efecto de muchos hongos en pastos perennes puede ser patógeno (Kononenko *et al.*, 2015; Masi *et al.*, 2017) y/o potencializar su resistencia a diversidad de presiones ambientales (Ali *et al.*, 2017); por su parte, *A. tenuissinna* está presente en cultivos de trigo (Perello *et al.*, 2015). Estas especies producen micotoxinas que pueden estar presentes en productos como harinas, concentrados y alimentos procesados, afectando seriamente la salud humana y animal (Pavón *et al.*, 2012).

Para el género *Fusarium* 1: la colonia presentó una coloración beige con micelio blanco que se tornó marrón al envejecer en medio de cultivo PDA y con formación de masas de esporas. Los esporodocios se observaron de color salmón-naranja con macroconidios delgados y curva dorsiventral de 26-38.5 x 3-4.9 µm, con 5-6 septos, célula apical ahusada, célula basal en forma de pie. Microconidios elipsoidales de 8.9-17.5 x 2.5-4.2 µm, con 0-3 septos y polifialides cortas, características correspondientes a *F. scirpi*, (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3A-3C). Esta especie es común en regiones templadas, áridas y semiáridas (Summerell, 2019), pastizales y tierras de cultivo. Se considera patógeno secundario, pero puede causar pudriciones en raíz de leguminosas. *Fusarium* 2: presentó coloración naranja pálido a salmón, en medio de cultivo PDA, abundante micelio algodonoso; macroconidios semirectos y ligeramente curvados de 27-36 x 3-4.5 µm con 3-5 septos, célula basal en forma

For the *Fusarium* 1 genus: the colony was beige in color with white mycelium that became brown as it grew older in PDA culture medium and spore masses were formed. The sporodochia observed were salmon-orange in color with thin macronidia showing a dorsiventral curve of 26-38.5 x 3-4.9 µm with 5-6 septa, needle-like apical cell, and foot-like basal cell. Ellipsoid microconidia measured 8.9-17.5 x 2.5-4.2 µm with 0-3 septa and short polyphialides, characteristics that correspond to *F. scirpi* (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 3A-3C). This species is common in temperate, arid y semiarid regions (Summerell, 2019), grasslands and farmlands. It is considered a secondary pathogen but can cause legume root rot. *Fusarium* 2: the colony was pale orange-salmon in color in PDA culture medium, with abundant cottony mycelium, semi-straight and slightly curved macronidia of 27-36 x 3-4.5 µm with 3-5 septa, foot-like basal cell, sharp and curved apical cell, with abundant mesoconidia with 1-3 septa. These characteristics match those of *F. incarnatum* (Leslie and Summerell, 2006) (Figure 3D-3F). This fungus is present in the soil and in a wide range of tropical-desert environments considered of minor economic importance and is associated with pearl millet seed (*Pennisetum americanum*) (Wilson, 2002), soybean (Chiotta *et al.*, 2015) and sorghum. Similarly, the presence of mycotoxins is often recognized in fodder with high moisture content and poor management: hay, silo and hay-silo. The presence of a great number of fungal metabolites (over 100, including mycotoxins, antibiotics and others whose action is not known) has been reported in cultivated fodder (Ramírez *et al.*, 2014) and grassland species. However, many of their effects on grazing cattle are unknown (Nichea *et al.*, 2015). Species belonging to the *F. incarnatum-equiseti* complex have been associated with diseases of grasses and mycotoxin production (Salvat *et al.*, 2013).

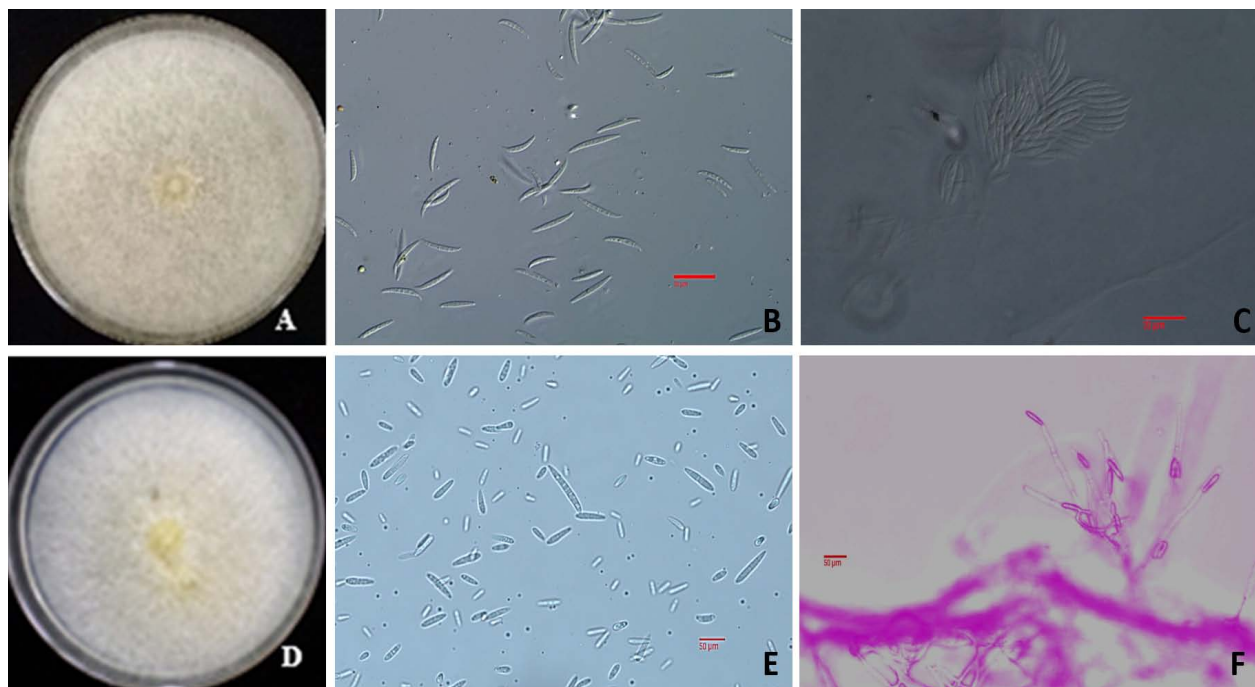


Figura 3. Características culturales y morfológicas de hongos asociados a semilla de pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colonia en PDA, B) Macroconidios, C) Esporodoquio. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colonia en PDA, E) Micro y Mesoconidios, F) Fiálides.

Figure 3. Cultural and morphological characteristics of fungi associated with seed of sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colony on PDA, B) Macroconidia, C) Sporodochium. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colony on PDA, E) Micro- and mesoconidia, F) Phialides.

de pie, célula apical afilada y curva; similarmente, presenta abundantes mesoconidios, con 1-3 septos. Estas características coinciden con *F. incarnatum* (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 3D-3F). Este hongo está presente en suelo y amplia gama de ambientes tropical-desérticos considerados de baja importancia económica y asociado a semilla de mijo perla (*Pennisetum americanum*) (Wilson, 2002), soya (Chiotta *et al.*, 2015) y sorgo; similarmente, es ampliamente reconocida la presencia de micotoxinas en forrajes que se usan con alto contenido de humedad mal manejados: henos, silo y heno-silo. La presencia de gran cantidad de metabolitos fúngicos (más de cien; entre micotoxinas, antibióticos y otros de acción desconocida) han sido reportadas en especies forrajeras cultivadas (Ramírez *et al.*,

Finally, the *Bipolaris* B-os genus: in PDA culture medium it produced colonies olive-brown in color with aerial mycelium, individual conidiophores with no ramification, that measured 43-160 x 4-6 μm , were septate and geniculated in the upper part, brown in color; and 21.5-49 x 10.5-15.8 μm conidia, smooth or slightly curved, cylindrical, brown in color with 2-6 septa, characteristics that correspond to *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014) (Figure 2G-2I). This fungus was reported for the first time on *Cynodon dactylon* in 1909. It is considered a secondary saprophyte pathogen and can invade a wide range of hosts within the grasses (Poaceae). It is considered of low economic importance and has been reported as a pathogen in various grass species (González *et al.*, 2006). For

2014) y del pastizal; sin embargo, se desconocen muchos de sus efectos sobre el ganado en pastoreo (Nichea *et al.*, 2015). Especies pertenecientes al complejo *F. incarnatum-equiseti* se han asociado a enfermedades en gramíneas y producción de micotoxinas (Salvat *et al.*, 2013).

Finalmente, el género *Bipolaris* B-os: presentó en medio de cultivo PDA, colonias de coloración olivo-oscuro con micelio aéreo, conidióforos individuales sin ramificación de 43-160 x 4-6 µm, septado y geniculado en la parte superior, de color marrón; conidios de 21.5-49 x 10.5-15.8 µm lisos o ligeramente curvados, cilíndricos, de color marrón, con 2-6 septos, características que corresponden a *B. cynodontis* Manamgoda *et al.* (2014) (Figura 2G-2I). Este hongo fue reportado por primera vez en *Cynodon dactylon* en 1909 y se considera como patógeno saprofita secundario y puede invadir amplia gama de hospedantes dentro de las gramíneas (Poaceae). Es considerado de baja importancia económica, reportado como patógeno en varias especies de pastos (González *et al.*, 2006). Por ejemplo, en *Chloris gayana* y *C. dactylon* induce manchas foliares (Hagan, 2005; Rodríguez, 2011).

Identificación y filogenia molecular. Basados en la identificación morfológica se enviaron por triplicado muestras de ADN de los géneros a Macrogen® Inc., Korea. Las secuencias de ADN obtenidas de los aislamientos tuvieron porcentaje de cobertura e identidad $\geq 99\%$ para distintas especies de cada género de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*; lo cual, confirmó la identificación previa de los géneros basada en caracteres morfológicos. Para determinar la identidad de cada aislamiento, se realizó filogenia molecular (Figura 4). Las secuencias correspondientes al género *Alternaria*, se agruparon en el clado que comprende a diez especies que

example, it induces foliar spots in *Chloris gayana* and *C. dactylon* (Hagan, 2005; Rodríguez, 2011).

Identification and molecular phylogeny. Based on the morphological identification, three DNA samples of the genera were sent to Macrogen® Inc., Korea. The DNA sequences obtained from the isolates were covered and identified by $\geq 99\%$ as being different species of each genus of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium*, which confirmed the previous identification of the genera based on morphological traits. Molecular phylogeny was used to determine the identity of each isolate (Figure 4). The sequences corresponding to the *Alternaria* genus were grouped in the clade that includes 10 species that form the *A. alternata* complex (Woudenberg *et al.*, 2013). There is little molecular variation, and to determine the specific morphotypes, three or more genes must be sequenced (Woudenberg *et al.*, 2015). However, based on their morphology (Simmons, 1995), it was corroborated that *Alternaria* F was *A. alternata*, and *Alternaria-cl* was *A. tenuissima*. *Bipolaris-os* sequencing was aligned with the clade that includes *B. coffeana* and *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014), both of which are phylogenetically related. Based on the morphology and the description of Manamgoda *et al.* (2014), it corresponds to *B. cynodontis*. The *Fusarium* sequences were aligned with the *incarnatum-equiseti* complex that includes four species: *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. lacertarum* and *F. scirpi*. The rDNA and EF1 ITS region did not show enough polymorphism to separate the four phylogenetically related species, which is in agreement with the results reported by O'Donnell *et al.* (2009). According to the morphology, F1 was identified as *F. scirpi* and F2 as *F. incarnatum*.

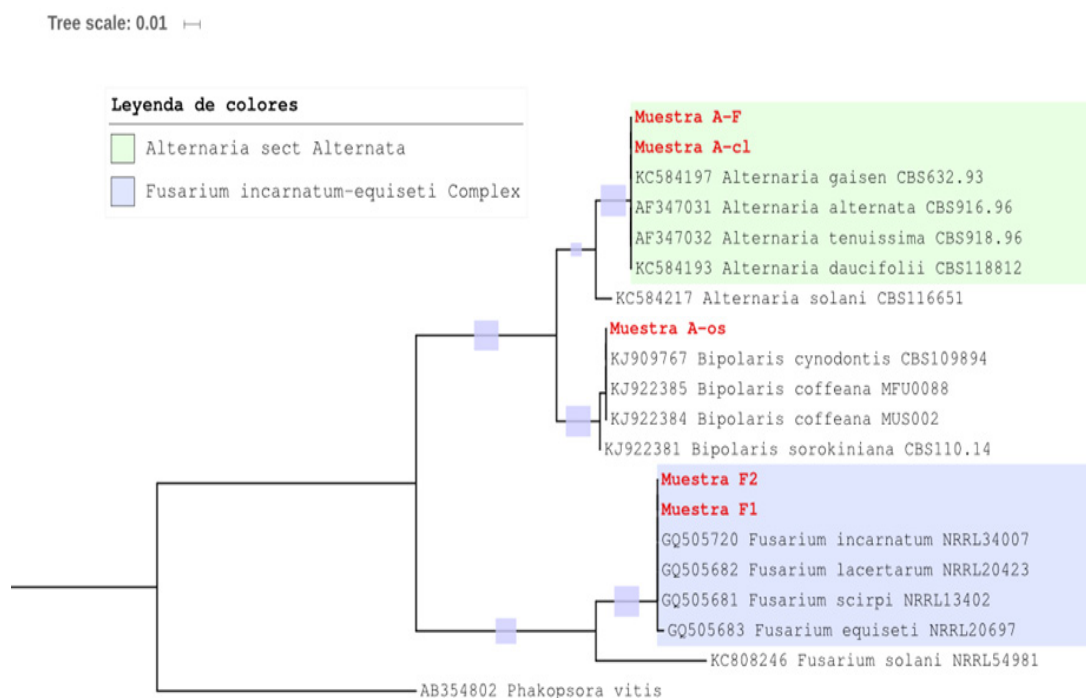


Figura 4. Análisis filogenético de los aislados de los géneros de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* asociados a la semilla de pasto Banderita del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Figure 4. Phylogenetic analysis of isolates of *Alternaria*, *Bipolaris* and *Fusarium* genera associated with sideoats gramma from Valle del Mezquital, Hidalgo.

conforman el complejo *A. alternata* (Woudenberg *et al.*, 2013). Existe escasa variación molecular y para determinar los morfotipos específicos, es necesario secuenciar tres o más genes (Woudenberg *et al.*, 2015). Sin embargo, por la morfología presentada (Simmons, 1995), se corroboró que *Alternaria* F fue *A. alternata* y *Alternaria-cl* fue *A. tenuissima*. La secuenciación de *Bipolaris-os* se alineó con el clado que comprende a *B. coffeana* y *B. cynodontis* (Manamgoda *et al.*, 2014), ambas especies relacionadas filogenéticamente. Acorde a la morfología observada y lo descrito por (Manamgoda *et al.*, 2014) corresponde a *B. cynodontis*. Las secuencias de *Fusarium*, se alinearon dentro del complejo *incarnatum-equiseti*, que incluye a cuatro especies: *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. lacertarum* y *F. scirpi*. La región ITS del rADN y EF1

CONCLUSIONS

The evaluated seeds had low phytosanitary quality because of the incidence of *Alternaria* spp. (67%), *Fusarium* spp. (24%) and *Bipolaris* spp. (9%) in the five varieties and the three types of propagule. The species *A. alternata*, *A. tenuissima*, *F. incarnatum*, *F. scirpi* and *B. cynodontis* were identified through morphological and molecular characterization and phylogeny as the main fungi associated with commercial seed of sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*) from Valle del Mezquital, Hidalgo. In Mexico, there are no previous studies about the presence of fungi in seed of native sideoats gramma, which is of great importance to recover grasslands. Based on this information, conducting further studies to determine

no presentó suficiente polimorfismo para separar entre estas cuatro especies filogenéticamente relacionadas; lo cual, concuerda con lo reportado por O'Donnell *et al.* (2009). De acuerdo con la morfología presentada se identificó a F1 como *F. scirpi* y F2 como *F. incarnatum*.

CONCLUSIONES

Las semillas evaluadas presentaron baja calidad fitosanitaria, ya que se encontraron a *Alternaria* spp. (67%), *Fusarium* spp. (24%) y *Bipolaris* spp. con 9% de incidencia en las cinco variedades y los tres tipos de propágulo. Las especies *A. alternata*, *A. tenuissinna*, *F. incarnatum*, *F. scirpi* y *B. cynodontis* fueron identificadas por caracterización morfológica, molecular y filogenia, como los principales hongos asociados en semilla comercial del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo. No existen en México estudios previos sobre la presencia de hongos en semilla de esta gramínea nativa de enorme importancia para recuperar pastizales. A partir de esta información, se recomienda realizar futuros estudios para determinar la patogenicidad de los hongos aislados en la semilla, así como estudios epidemiológicos en condiciones de campo con el fin de poder desarrollar estrategias asertivas para promover mayor calidad sanitaria de semilla y mejorar la probabilidad de establecimiento de praderas de alto riesgo, en condiciones de temporal semiárido.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la propuesta de Problemas Nacionales 2014 (248252): "Colecta, salvaguarda y evaluación de forrajeras (Poaceae) para pastoreo extensivo, nativas de México semiárido"; similarmente, por el apoyo

the pathogenicity of the fungi isolated from seed is recommended, as well as epidemiological studies in the field in order to develop assertive strategies to promote higher sanitary quality of seed and improve the probability of establishing high-risk prairies under semiarid rainfed conditions.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for its support through the proposal of Problemas Nacionales 2014 (248252): "Colecta, salvaguarda y evaluación de forrajeras (Poaceae) para pastoreo extensivo, nativas de México semiárido" (Collection, safeguarding and evaluation of fodder crops (Poaceae) for extensive grazing, native to semiarid Mexico) and for the financial support it provided for conducting research through the Masters in Science scholarship granted to the second author of this study.

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

financiero brindado para el desarrollo de este trabajo a través de la beca de Maestría en Ciencias otorgada a la segunda autora.

## LITERATURA CITADA

- Afzal I, R Shabir, and S Rauf. 2019. Seed production technologies of some major field crops. *In*: Hasanuzzaman M. (ed.) *Agronomic Crops*. Springer, Singapore. pp. 655-678.
- Ali S, TC Charles, BR Glick. 2017. Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. *In*: Doty S (ed.) *Functional Importance of the Plant Microbiome*. Springer. Chap. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1_6)
- Arriagada RV. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 115 p. <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf> (consulta, diciembre 2018).
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Ilustred Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p.
- Bautista EE, Leyva MG, Villaseñor ME, Huerta EJ y Mariscal AA. 2011. Hongos asociados al grano de trigo sembrado en áreas del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(2):175-177. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a11.pdf>

- Chiotta ML, Chulze S y Barros G. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 47(2):171-184. <https://doi.org/10.19137/qs.v7i0.687>
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2018. Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Ixmiquilpan (1312), Estado de Hidalgo. Subdirección General Técnica. Gerencia de Aguas Subterráneas. Subgerencia de Evaluación y Ordenamiento de Acuíferos. *Diario Oficial de la Federación*. Enero 4, 2018. 34 p.
- Cook RJ. 2010. *Fusarium* root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. In: Compendium of wheat diseases and pests. In: W.W. Bockus, R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray, and R. Smiley (eds.). 3<sup>rd</sup>. Ed. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA. p. 37-39. <https://doi.org/10.1080/10496505.2011.564100>
- Crous PW, Verkley GJ, Groenewald JZ, and Samson RA. 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, Netherlands. 269 p.
- Fraire CL, Nieto AD, Cárdenas SE, Gutiérrez AG, Bujanos MR y Vaquera HH. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):25-33. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003)
- García LE, Leyva MG, Villaseñor ME, Rodríguez GF y Tovar PM. 2013. Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos de reporte nuevo en avena (*Avena sativa* L.), en la meseta central de México. *Agrociencia* 47(8):815-827. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i8.1090>
- Gilchrist SL, Fuentes GC, Martínez CA, López RE, Duveiller PS, Henry MI y García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda Ed. 68 p. México. CIMMYT. (Consulta, mayo 2018). <https://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/1272>
- González AG, López MM, Novo A, Estrada ZV, López GM, Bernal DA, Granda BA, Rodríguez AG, Figueredo GG, Pupo LZ, Ramos AD, González M, Ruiz MG, Pérez MG, Nápoles IA, García CR, Sánchez GC, Buchillón R y López CM. 2006. Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad* 10(1):11-18. <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116158002.pdf>
- Hagan A. 2005. Leaf spot and rust diseases of turf grasses. Alabama Cooperative. Extension System. <https://ssl.acesag.auburn.edu/pubs/docs/A/ANR-0621/ANR-0621-archive.pdf> (consulta, diciembre 2018).
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf> (consulta, junio de 2019)
- Kidd SE, Sharon C, Chen A, Meyer W, Halliday CL. 2019. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready? *Frot. Microbiol.* 10: 2903. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02903>
- Kononenko, GP, Burkin AA, Gavrilova OP, Gagkaeva TY. 2015. Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated grasses and legumes crops. *Agricultural and Food Science.* 24:323-330. <https://doi.org/10.23986/afsci.52313>
- Lamichhane JR, You MP, Laudinot V, Barbette MJ, and Aubertot JN. 2020. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. *Plant Disease* 104:610-623. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1157-FE>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, United States of America. 388 p. ISBN/ISSN: 978-0-8138-1919-8
- Lezcano JC, Martínez B y Alonso O. 2010. Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes* 33(1):1-14 pp. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v33n1/pyf04110.pdf>
- Lezcano JC, Navarro M, González Y y Alonso O. 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. *Pastos y Forrajes* 30(1):107-118. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v30n1/pyf06107.pdf>
- Manamgoda DS, Rossman A, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, and Hyde KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Micology* 79:221-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Mariscal AL, Rivera YA, Dávalos GP y Ávila MD. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia* 51(6): 673-681. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00673-en.pdf>
- Masi, M, Meyer S, Pescitelli G, Cimmino A, Clement S, Peacock B, and Evidente A. 2017. Phytotoxic activity against *Bromus tectorum* for secondary metabolites of a seed-pathogenic *Fusarium* strain belonging to the *F. trincinctum* species complex. *Natural Product Res.* 31(23):2768-2777. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1297445>
- Morales NC, Quero CA, Melgoza AC, Martínez SM y Jurado GP. 2009. Diversidad forrajera del pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Técnica Pecuaria México* 47(3):231-244. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v7i2.4174>
- Nichea MJ, Cendoya E, Zchetti VGL, Chiacchiera SM, Sul-yok M, Krska R, Torres AM, Chulze SN, and Ramírez ML. 2015. Mycotoxin profile of *Fusarium armeniacum* isolated from natural grasses intended for cattle feed. *World Mycotoxin Journal* 8(4): 451-457. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1770>
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, and Geiser DM. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J Clinical Microbiology* 47(12):3851-3861. <https://doi.org/10.1128/jcm.01616-09>
- Pavón MM, González AI, Martín SR y García LT. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27(6):1772-1781. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
- Perello AE, Aulicino MB, Martinelli C, Regueira M, Moreno MV y Stenglein S. 2015. Caracterización morfo-cultural de



- nuevos grupos taxonómicos de *Alternaria*, asociados a enfermedades del trigo en Argentina. *Revista Ciencias Morfológicas* 17(1):1-15. <https://doi.org/10.35537/10915/53343>
- Pirelli GJ, Anderson NP, Craig AM, and Young CA. 2016. Endophyte toxins in grass and other feed sources. Risk to Livestock. EM-9156. Oregon State University. 10 p. <http://oregonstate.edu/endophyte-lab/files/ext-pub-nov-2016.pdf> (Consulta, marzo, 2020).
- Quero, CAR, Enriquez QJF y Miranda JL. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o *status quo*. *Interciencia* 32(8):566-571. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000800014](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000800014)
- Quero CA, Miranda J. L., Villanueva, Á. J. F. 2017. Recursos genéticos de gramíneas para el pastoreo extensivo. Condición actual y urgencia de su conservación ante el cambio climático. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 3:63-85.
- Quero-Carrillo AR, Miranda-Jiménez L, Hernández-Guzmán F y FA Rubio A. 2014. Mejora del establecimiento de praderas de temporal. Folleto Técnico. Colegio de Postgraduados. ISBN: 978-607-715-213-2 31p. <http://doi.org/10.13140/2.1.5101.2161>
- Ramírez ML, Chulze SN, Torres MA, Zchetti GV, Nichea JM, Cendova E y Palacios AS. 2014. Variación estacional de la presencia de micotoxinas en pasturas naturales destinadas a la alimentación bovina. *SNS (Argentina)* 4:49-54.
- Rodríguez G. 2011. Patógenos fúngicos que afectan a gramíneas procedentes de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Las Tunas”. Unidad Experimental “Indio Hatuey”, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Cuba. <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/tesis/tesism/gisellerodriguez.pdf> (consulta, septiembre 2018).
- Rodríguez, CG, Iglesias C, Nieto TM y Palmero D. 2009. La enfermedad de la punta negra del trigo. *Agricultura. Revista Agropecuaria* 195:118-121. ISSN 0002-1334. (consultada, mayo 2019). <http://oa.upm.es/15517/>
- Ruiz CF, Ríos VC, Berlanga RD, Ornelas PJ, Acosta MC, Romo CA, Zamudio FP, Pérez CD, Salas MM, Ibarra RJ y Fernández PS. 2017. Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3):437-462. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>
- Sainz MJ, Aguin O, Bande MJ, Pintos C y Mansilla JP. 2012. Biodiversidad de especies de *Fusarium* en tallos de maíz forrajero en Galicia. *Pastos* 42(1):51-56.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salvat A, Balbuena O, Ricca A, Comerio R, Rosello BJ, Rojas D, Berretta M, Delssin E, Bedascarrasbure E y Salerno J. 2013. Presencia de zearalenona en pasturas del Este del Chaco. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 39(1):31-36.
- Sambrook J and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press 1:1. 32-1. 34 p.
- Simmons EG. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon*. 55:55-163.
- Summerell BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Ann Rev. of Phytopatology*. 57:323-339. <https://doi.org/10.1146/annualvev-phyto-082718-100204>.
- Tamura K, Nei M, and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Warham E.J., Butler L. y Sutton B. 1998. *Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. Manual de Laboratorio*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México. 64 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and Direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ, White TJ. (eds.) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, CA, USA p. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.5002-1>
- Wilson JP. 2002. Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease* 86:833-839. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.8.833>
- Woudenberg JH, Groenewald JZ, Binder M, and Crous PW. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75(1):171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Woudenberg JH, Seidl MF, Groenewald JZ, Vries M, Stielow JB, Thomma BP, and Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82:1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>