

Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State

Identificación de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* en el Estado de México

Iván Leal-León, ¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrarias, km. 15.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, El Cerrillo Piedras Blancas, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México; Magnolia Moreno-Velázquez, ²Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Avenida Centenario de la Educación, Colonia Santa Ana, C.P. 55740, Tecámac, Estado de México, México; ¹Jesús Ricardo Sánchez-Pale; ²Andrés Quezada-Salinas*.

*Corresponding autor: andresqsa79@gmail.com

Received: February 10, 2023.

Accepted: April 11, 2023.

Leal-León I, Moreno-Velázquez M, Sánchez-Pale JR and Quezada-Salinas A. 2023. Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 257-267.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-6>

First DOI publication: April 28, 2023.

Primera publicación DOI: 28 de Abril, 2023.

Abstract. During the years 2017 and 2018, leaves and stems with dark brown lesions containing hypophilic telia surrounded by chlorotic halos were collected from *Sphaeralcea angustifolia* plants located in Axapusco, State of Mexico. Based on the morphological characteristics, the fungus *Puccinia sherardiana* was identified. Uredinal stage was not detected during the observation period. Verification of the identity of the fungus was carried out by

Resumen. Durante los años 2017 y 2018, se recolectaron hojas y tallos con lesiones café oscuras conteniendo telios hipófilos rodeados por halos cloróticos en plantas de *Sphaeralcea angustifolia* localizadas en Axapusco, Estado de México. Con base en las características morfológicas, se identificó al hongo *Puccinia sherardiana*. No se detectó el estado uredinial durante el periodo de observación. La verificación de la identidad del hongo se realizó mediante un análisis filogenético con parte de una secuencia del gen 28S del ADN ribosómico. Se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de *S. angustifolia* mediante la inoculación de teliosporas. Las plantas inoculadas desarrollaron síntomas y signos 15 días después de la inoculación, iniciando con la presencia de ecios errumpentes en la epidermis del hospedante y posteriormente la formación de telios, completando los Postulados de Koch. El hongo *P. sherardiana* se describió previamente como una roya con ciclo de vida microcíclico

means of a phylogenetic analysis with part of a sequence of the 28S gene of ribosomal DNA. Pathogenicity tests were performed on *S. angustifolia* plants by inoculating teliospores. The inoculated plants developed symptoms and signs 15 days after inoculation, beginning with the presence of eruptive aecia in the epidermis of the host and later the formation of telia, completing Koch's Postulates. The fungus *P. sherardiana* was previously described as a rust with a microcyclic life cycle on species of the genera *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* and *Sphaeralcea*, belonging to the Malvaceae family; however, in this study the pathogen behaved differently. *P. sherardiana* will continue to be studied to determine if its life cycle is demicyclic in Mexico.

Key words: morphology, pathogenicity test, phylogenetic analysis, rust.

The genus *Sphaeralcea*, which belongs to the Malvaceae family, is comprised of approximately 40 species mainly distributed in the western part of North America. More than half of these species are found in Mexico, with the most representative being *Sphaeralcea angustifolia* Cav. G. Don., commonly known as “vara de San José,” “hierba del negro,” or “tlixihuitl” in the Nahuatl language (Rzedowski and Rzedowski, 2005). This species is widely distributed (McVaugh, 2001). Andrade-Ceto (2009) reports that it has been used for its anti-inflammatory effect in diseases such as tonsillitis, bronchitis, conjunctivitis, rheumatism, bruises, and hemorrhoids. It is also used as a healing agent and for the treatment of gastrointestinal disorders such as diarrhea and dysentery (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Calzada *et al.*, 2017) and osteoarthritis (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

The Pucciniales (Basidiomycota) are a group of fungi that parasitize vascular plants, with complex

sobre especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, pertenecientes a la familia Malvaceae; sin embargo, en este estudio el patógeno tuvo un comportamiento diferente. Se continuará estudiando a *P. sherardiana* para determinar si en México su ciclo de vida es demicíclico.

Palabras clave: morfología, patogenicidad, análisis filogenético, roya.

El género *Sphaeralcea* perteneciente a la familia Malvaceae, está representado por alrededor de 40 especies que se encuentran principalmente en la parte occidental de Norteamérica, y más de 50% se distribuyen en México, la especie más representativa es *Sphaeralcea angustifolia* Cav. G. Don., una planta comúnmente conocida como vara de San José, hierba del negro o tlixihuitl en la lengua náhuatl (Rzedowski y Rzedowski, 2005), la cual se encuentra ampliamente distribuida (McVaugh, 2001). Andrade-Ceto (2009) reporta que ha sido utilizada por su efecto antiinflamatorio en enfermedades como tonsilitis, bronquitis, conjuntivitis, reumatismo, contusiones y hemorroides. También se utiliza como cicatrizante, en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales como diarrea y disentería (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Calzada *et al.*, 2017) y la osteoartritis (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

Los Pucciniales (Basidiomycota) son un orden de hongos parásitos obligados de plantas vasculares, con ciclos de vida complejos y causantes de enfermedades conocidas como royas (Toome-Heller, 2016; Aime *et al.*, 2018). En la actualidad, se estima que existen de 7500 a 8500 especies descritas de Pucciniales siendo el género *Puccinia* el que más pérdidas económicas causa (Toome-Heller, 2016) y el que comprende el mayor número de especies reportadas con aproximadamente 4000. Por lo anterior, y por la alta especificidad con sus hospedantes,

life cycles and causing diseases known as rusts (Toome-Heller, 2016; Aime *et al.*, 2018). There are currently an estimated 7,500 to 8,500 described species of Pucciniales, with the genus *Puccinia* causing the most economic losses (Toome-Heller, 2016) and comprising approximately 4,000 species. Due to their high host specificity, studying their evolution is complicated (Aime *et al.*, 2018). *Puccinia sherardiana* (Horst, 2013; Demers *et al.*, 2015) affects different species of the genera *Sphaeralcea*, *Sidalceae*, *Althaea*, *Malvastrum*, *Alcea* (Malvaceae). This rust is reported as microcyclic (Briere and Franc, 1998; Dugan and Nazaire, 2011) and produces symptoms and signs in the stem and leaves, such as the presence of dark brown telia surrounded by chlorotic halos. These symptoms have been reported in *Sphaeralcea grossulariaefolia*, *S. munroana*, and *Sidalcea malviflora* in the USA (Briere and Franc, 1998; Sampangi *et al.*, 2010). The objectives of this study were to observe the life cycle of *P. sherardiana* in *S. angustifolia*, provide a detailed morphological description of the fungus, and confirm its pathogenicity.

From June to August in 2017 and 2018, *S. angustifolia* plants with sori were collected in the Santa Maria region (19°51'23.60" N, 98°44'57.02" W), Axapusco, State of Mexico. To describe the pathogen morphometrics, spermatia, aeciospores, teliospores, and sections of spermogonia, aecia, and telia were mounted separately in a drop of lactophenol with cotton blue on glass slides for observation under light microscopy. The morphology and size of 50 spores were determined at a magnification of 40X. The surface structures of the aeciospores and teliospores were observed directly using a scanning electron microscope (Carl Zeiss®). Telia and teliospores characteristics were compared with taxonomic keys and descriptions by Hotson (1934) and Arthur (1962).

se complica el estudio de su evolución (Aime *et al.*, 2018). Diferentes especies de los géneros *Sphaeralcea*, *Sidalceae*, *Althaea*, *Malvastrum*, *Alcea* (Malvaceae), son afectadas por *Puccinia sherardiana* (Horst, 2013; Demers *et al.*, 2015), una roya reportada como microcíclica (Briere y Franc, 1998; Dugan y Nazaire, 2011), la cual se caracteriza por producir síntomas y signos tanto en el tallo como en las hojas que consisten de la presencia de telios de color café oscuro, rodeados por halos cloróticos. Estos síntomas se han reportado en *Sphaeralcea grossulariaefolia*, *S. munroana* y *Sidalcea malviflora* en EE. UU. (Briere y Franc, 1998; Sampangi *et al.*, 2010). Los objetivos del presente trabajo fueron observar el ciclo de *P. sherardiana* en *S. angustifolia*, realizar una descripción morfológica detallada del hongo y verificar su patogenicidad.

Durante junio a agosto, en los años 2017 y 2018, se recolectaron plantas de *S. angustifolia* con desarrollo de soros, en la región de Santa María (19°51'23.60" N, 98°44'57.02" O), Axapusco, Estado de México. Para la descripción morfométrica del patógeno, los espermacios, eciosporas y teliosporas, así como secciones de los espermogonios, ecios y telios se montaron por separado en una gota de lactofenol con azul de algodón sobre portaobjetos para su observación en microscopía de luz. Se determinó la morfología y tamaño de 50 esporas a una magnificación de 40X. Las estructuras superficiales de las eciosporas y teliosporas se observaron directamente usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carl Zeiss®). Las características de los telios y teliosporas se compararon con claves taxonómicas y descripciones realizadas previamente por Hotson (1934) y Arthur (1962).

Para confirmar la identidad del hongo, se rasparon eciosporas a partir de un ecio de plantas sintomáticas colectadas en campo, a partir del cual se extrajo el ADN. La calidad del ADN se verificó

To confirm the identity of the fungus, aeciospores were collected from an aecium of symptomatic plants in the field and DNA was extracted from them. The quality of the DNA was verified by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light using an M-26X transilluminator (UVP Ltd®, USA). The identity of the fungus was confirmed by amplifying part of the 28S ribosomal DNA gene (including D1 and D2 domains) using the LR0R and LR6 primers (Vilgalys and Hester, 1990, Aime *et al.*, 2006). Each reaction mixture (50 µL) contained PCR Buffer 1X, 0.02 U µL⁻¹ of DNA polymerase (Promega®, USA), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.8 Mm of each primer, and 2 ng of template DNA. The PCR was carried out in a Bio-Rad C1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories®, USA) with initial denaturation at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 90 s, 50 °C for 60 s, 72 °C for 90 s (alignment), followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplified PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen®, USA) and sequenced at Macrogen (Seoul, Korea). Similar sequences deposited in the GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) were obtained using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. The matrices were compiled using the MEGA 5.0.5 program and analyzed using Bayesian inference criteria. The alignments were performed online using the MAFFT 7 program with E-INS-i and FFT-NS-i strategies and default parameters.

Plants of *S. angustifolia* were propagated under isolated conditions in a greenhouse. The plants were potted in polyethylene bags with a substrate comprised of agrolite, peat, and forest soil in a ratio of 20, 30, and 50%, respectively. The mixture was sterilized in an autoclave at 121 lb three times for 30 minutes each time. At six weeks of age, the plants were inoculated via leaf spray with

mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV usando un transiluminador M-26X (UVP Ltd®, EE. UU.). Se amplificó por PCR parte del gen 28S del ADN ribosómico (incluyendo los dominios D1 y D2) usando los iniciadores LR0R y LR6 (Vilgalys y Hester, 1990, Aime *et al.*, 2006). Cada mezcla de reacción (50 µL) contenía Buffer para PCR 1X, 0.02 U µL⁻¹ de ADN polimerasa (Promega®, EE. UU.), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 Mm de cada iniciador y 2 ng de ADN molde. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories®, EE. UU.) usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 90 s, 50 °C por 60 s, 72 °C por 90 s (alineamiento), seguido de una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos amplificados de PCR se purificaron usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen®, EE. UU.), y se secuenciaron en la empresa Macrogen (Seúl, Corea). Se realizaron búsquedas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener secuencias similares depositadas en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las matrices fueron compiladas utilizando el programa MEGA 5.0.5. Los alineamientos fueron realizados en internet utilizando el programa MAFFT 7 mediante las estrategias E-INS-i y FFT-NS-i y los parámetros por defecto. Las matrices fueron analizadas utilizando criterios de inferencia Bayesiana.

Plantas de *S. angustifolia* se reprodujeron bajo condiciones aisladas en invernadero. Las plantas se colocaron en bolsas de polietileno con sustrato a base de agrolita, turba y tierra de monte en una proporción de 20, 30 y 50%, respectivamente; la mezcla se desinfectó en autoclave a 121 lb tres veces durante 30 min cada vez. Cuando las plantas alcanzaron una edad de seis semanas, las hojas se inocularon mediante aspersión con una suspensión

a suspension of teliospores at a concentration of 1×10^4 teliospores mL^{-1} , sourced from plants displaying symptoms of the pathogen. Inoculated plants were kept in greenhouse conditions, with an average temperature of 22 °C during the day and 18 °C at night, and relative humidity of 60%. The experiment was replicated twice.

In the field, symptoms began as light green circular spots on both the adaxial and abaxial surfaces of the leaves (Figure 1A and 1B). Small

de teliosporas a una concentración de 1×10^4 teliosporas mL^{-1} , estas se obtuvieron a partir de plantas con signos del patógeno. Las plantas inoculadas se conservaron bajo condiciones de invernadero (temperatura promedio de 22 °C en el día y 18 °C durante la noche y 60 % de humedad relativa). El ensayo se repitió dos veces.

En campo, los síntomas iniciaron con una decoloración verde claro en forma de manchas circulares que se observaron por ambos lados de la hoja

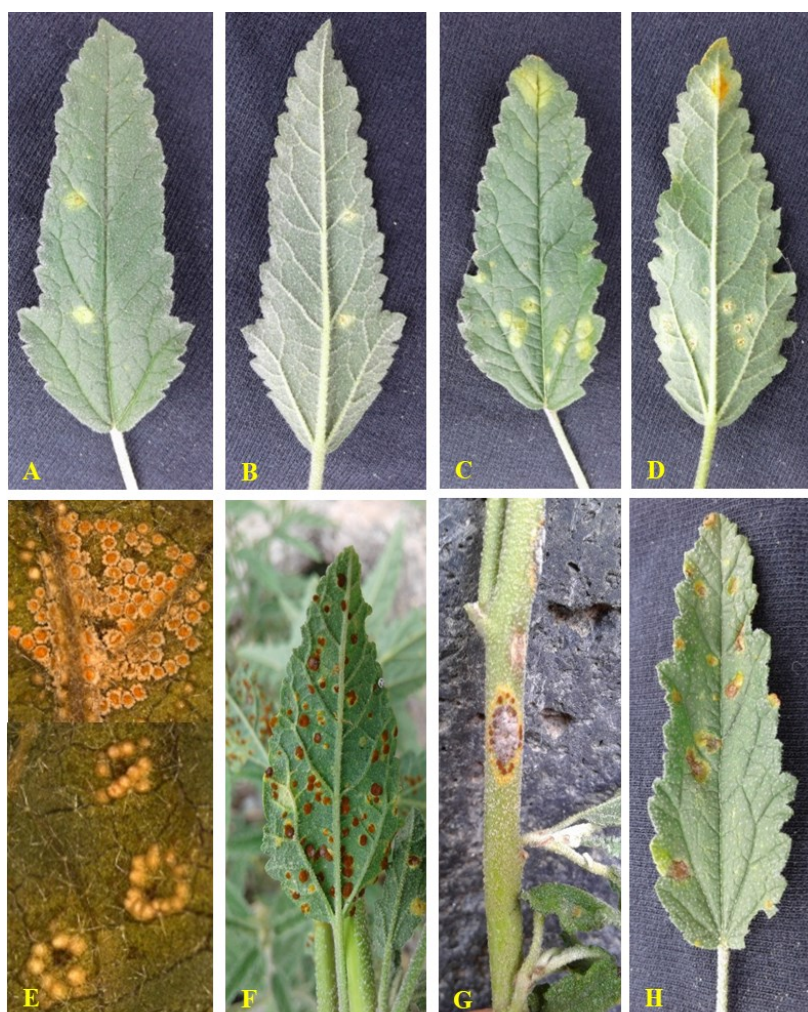


Figure 1. Symptoms and signs induced by *Puccinia sherardiana* in plants of *Sphaeralcea angustifolia*. A, B) Light green circular spots; C, D and E) Development of yellow aecia; F and G) Development of telia on leaf and stem; H) Telia delimited by a chlorotic halo.

Figura 1. Síntomas y signos inducidos por *Puccinia sherardiana* en plantas de *Sphaeralcea angustifolia*. A, B) Manchas circulares de color verde claro; C, D y E) Desarrollo de ecios de color amarillo; F y G) Desarrollo de telios en hoja y tallo; H) Telios delimitados por una halo clorótico.

light brown dots subsequently developed in the center of the spots, corresponding to the formation of spermogonia. The spots then progressed to a light yellow color and irregularly increased in size, accompanied by the development of yellow aecia and aeciospores on the abaxial surface (Figure 1C, 1D, and 1E). Telia were then formed (Figure 1F), which gave rise to teliospores. Both telia and teliospores were exclusively observed on the abaxial surface, as well as on the stem (Figure 1G). Telia were surrounded by chlorotic halos, and lesions of brown color delimited by the chlorotic halo were observed on the adaxial surface (Figure 1H).

The pycnia (spermogonia) were found to develop in small groups on opposite sides of the aecium. These structures were epiphyllous, subepidermal, and belonged to the V group type 4 classification (Cummins and Hiratsuka, 2003) light brown, located on opposite sides of the ecium, globose, 120-150 μm in diameter (Figure 2A).

The pycniospores (spermatia) were ellipsoidal to subglobose, hyaline to yellowish, and not septate, measuring $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$. The aecia were observed to be hypophyllous, cup-shaped, and clustered with a light brown color, measuring 219-230 μm in diameter (Figura 2B, 2C). The aeciospores were oblong to ellipsoidal, finely echinulate, $16.46 \times 14.38 \mu\text{m}$, and possessed a hyaline wall 1.5 μm thick, with the inner part appearing light brown or yellowish (Figura 2D). The telia found on stems were hypophyllous, cushion-shaped, verrucose, and regularly confluent, with a reddish-brown to dark brown color. Teliospores appeared mostly ellipsoidal to oblong, bicellular, and contained a central constriction with an apical pore. They averaged $15 \times 42 \mu\text{m}$ and had smooth, dark brown or brown walls, measuring 0.5-1.5 μm thick at the sides and 1.5-3 μm apically (Figura 2E, 2F). The teliospore pedicels were usually yellowish,

(adaxial y abaxial) (Figura 1A y 1B); en el centro se desarrollaron pequeños puntos de color café claro que correspondieron a la formación de los espermogonios; posteriormente, las manchas se tornaron de color amarillo claro y crecieron en tamaño de forma irregular, en esta etapa en la parte abaxial se observó el desarrollo de ecios y eciosporas de color amarillo (Figura 1C, 1D y 1E). Posteriormente, se formaron los telios (Figura 1F) y estos dieron origen a teliosporas, ambos casos sucedieron únicamente en la parte abaxial, así como en el tallo (Figura 1G); los telios estuvieron delimitados por halos cloróticos, en la parte adaxial se distinguieron lesiones de color café delimitadas por el halo clorótico (Figura 1H).

Los picnios (espermogonios) se desarrollaron en grupos pequeños y fueron epífilos, subepidermales, del grupo V tipo 4 (de acuerdo con la clasificación de Cummins y Hiratsuka, 2003), cafés claros, localizados en lados opuestos del ecio, globosos, de 120-150 μm de diámetro (Figura 2A). Las picniosporas (espermacios) fueron hialinos a amarillentos, no septados, elipsoidales a subglobosos, de $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$. Los ecios fueron hipófilos, cupulados, agrupados, café claro, de 219-230 μm de diámetro (Figura 2B, 2C). Las eciosporas fueron oblongas a elipsoidales, finamente equinuladas, de $16.46 \times 14.38 \mu\text{m}$, con pared hialina de 1.5 μm de grosor, pero con la parte interior café claro o amarillento (Figura 2D). Los telios sobre tallos fueron hipófilos, pulvinados, verrucosos, regularmente confluentes, café rojizo a café oscuro. Las teliosporas se presentaron en grupos, mayormente elipsoidales a oblongas, con una constricción central, bicelulares, con poro apical, de tamaño promedio de $15 \times 42 \mu\text{m}$, lisa, café oscuro a café, con pared de 0.5-1.5 μm de grosor a los lados y 1.5-3 μm apicalmente (Figura 2E, 2F). Los pedicelos de las teliosporas usualmente fueron amarillentas, persistentes, de 105 μm de longitud y con paredes lisas de 1.5 μm de grosor. Basados en

persistent, 105 μm long, and had smooth walls 1.5 μm thick. *Puccinia sherardiana* was identified as the rust based on morphological characteristics of the teliospores, according to previous studies (Arthur, 1962; Dugan and Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). The observation period did not reveal the uredinial state.

características morfológicas de las teliosporas, la roya se identificó como *Puccinia sherardiana* (Arthur, 1962; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). El estado uredinial no se presentó durante el periodo de observaciones.

Los síntomas y signos foliares se observaron a los 15 días después de la inoculación en invernadero,

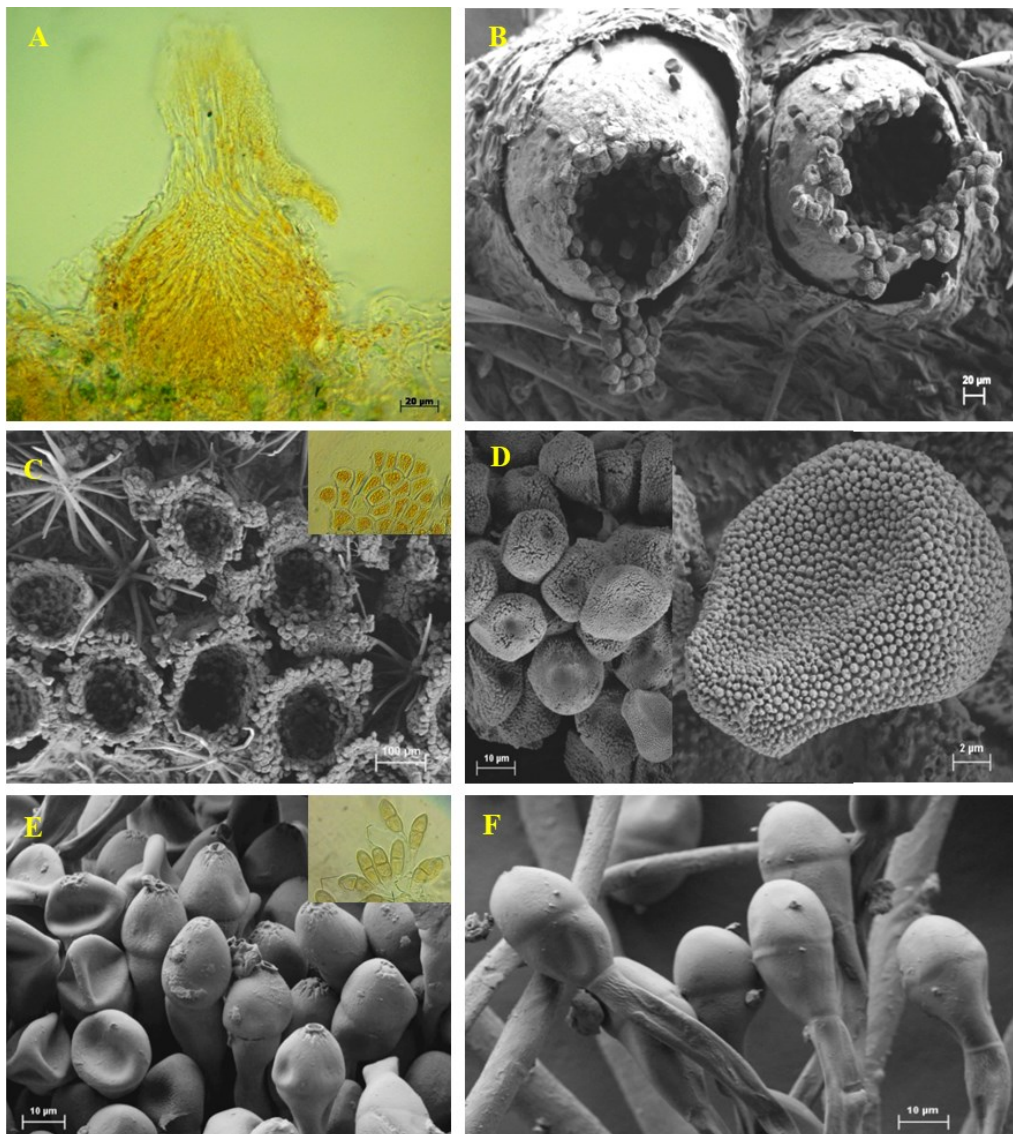


Figure 2. Reproductive structures of *Puccinia sherardiana* as seen by light microscopy (A) and scanning electron microscopy (B-F). A) Longitudinal section of a spermogonium. B-C) Eciospores. D) Eciosporas. E-F) Teliosporas.

Figura 2. Estructuras de reproducción de *Puccinia sherardiana* vistas en microscopia de luz (A) y microscopia electrónica de barrido (B-F). A) Corte longitudinal de un espermogonio. B-C) Ecios. D) Eciosporas. E-F) Teliosporas.

Symptoms and signs on leaves were observed 15 days after greenhouse inoculation. Ecia were observed in formation at this time, which subsequently gave rise to eciospores after rupturing the leaf epidermis. The formation of telia and teliospores was observed five days later. The characteristics of the teliospores were observed and confirmed to be consistent with those of *P. sherardiana*, completing Koch's Postulates.

The sequence generated in this study was deposited in the GenBank database under accession number MN967778.1. Phylogenetic analysis was conducted using the partial sequence of the 28S gene and the Bayesian inference criterion. The analysis showed a posterior probability value of 0.99 with sequences of *P. sherardiana* isolates BPI871783 and BPI102198 (Figure 3).

Puccinia sherardiana has been reported infecting various species within the family Malvaceae in the United States (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregon, Washington, Idaho, Nebraska, New Mexico, Texas, Utah, Wyoming, Montana, and North Dakota) infecting different species of the genera *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* and *Sphaeralcea*, within the family of the family Malvaceae (Arthur, 1962; Briere and Franc, 1998; Dugan and Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). In Mexico, the presence of *P. sherardiana* was reported by Arthur (1962), but information about the collection site or host was not provided. Demers *et al.* (2015) identified this rust in two specimens (origin unknown) of *Sphaeralcea* sp. intercepted in El Paso, Texas, from goods entering from the border with Mexico. Morphometrically, teliospore characteristics of *P. sherardiana* identified on *S. angustifolia* were similar to those reported by Arthur (1962), Briere and Franc (1998), Dugan and Nazaire (2011), and Demers *et al.* (2015), but differences were found in this study. The teliospores were narrower (15.8 μm) than the size reported

tiempo en el cual se presentaron ecios en formación, los cuales posteriormente dieron origen a la formación de eciosporas, después de romper la epidermis de la hoja. Cinco días después se observó la formación de telios y teliosporas, estas últimas fueron observadas para completar los Postulados de Koch, sus características correspondieron con las observadas previamente para el caso de *P. sherardiana*.

La secuencia generada en este estudio se depositó en la base del GenBank con número de acceso MN967778.1. El análisis filogenético generado con la secuencia parcial del gen 28S y usando el criterio de inferencia Bayesiana mostró un valor de 0.99 de probabilidad posterior con secuencias de los aislados BPI871783 y BPI102198 de *P. sherardiana* (Figura 3).

Puccinia sherardiana se ha reportado en los EE. UU. (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregón, Washington, Idaho, Nebraska, Nuevo México, Texas, Utah, Wyoming, Montana y North Dakota) infectando diferentes especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, dentro de la familia Malvaceae (Arthur, 1962; Briere y Franc, 1998; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). En el caso de México, Arthur (1962) mencionó que *P. sherardiana* está presente en el país; sin embargo, no se proporcionaron datos del sitio de colecta ni del hospedante; por su parte Demers *et al.* (2015), identificaron a esta roya en dos especímenes (de origen desconocido) de *Sphaeralcea* sp., en intercepciones realizadas en El Paso, Texas, en mercancía que entraba por la frontera de México. En lo que respecta a la morfometría, las características de las teliosporas de *P. sherardiana* identificadas sobre *S. angustifolia* fueron similares a las reportadas por Arthur (1962), Briere y Franc (1998), Dugan y Nazaire (2011) y Demers *et al.* (2015). Sin embargo, en este estudio se presentaron diferencias, por ejemplo, las teliosporas fueron

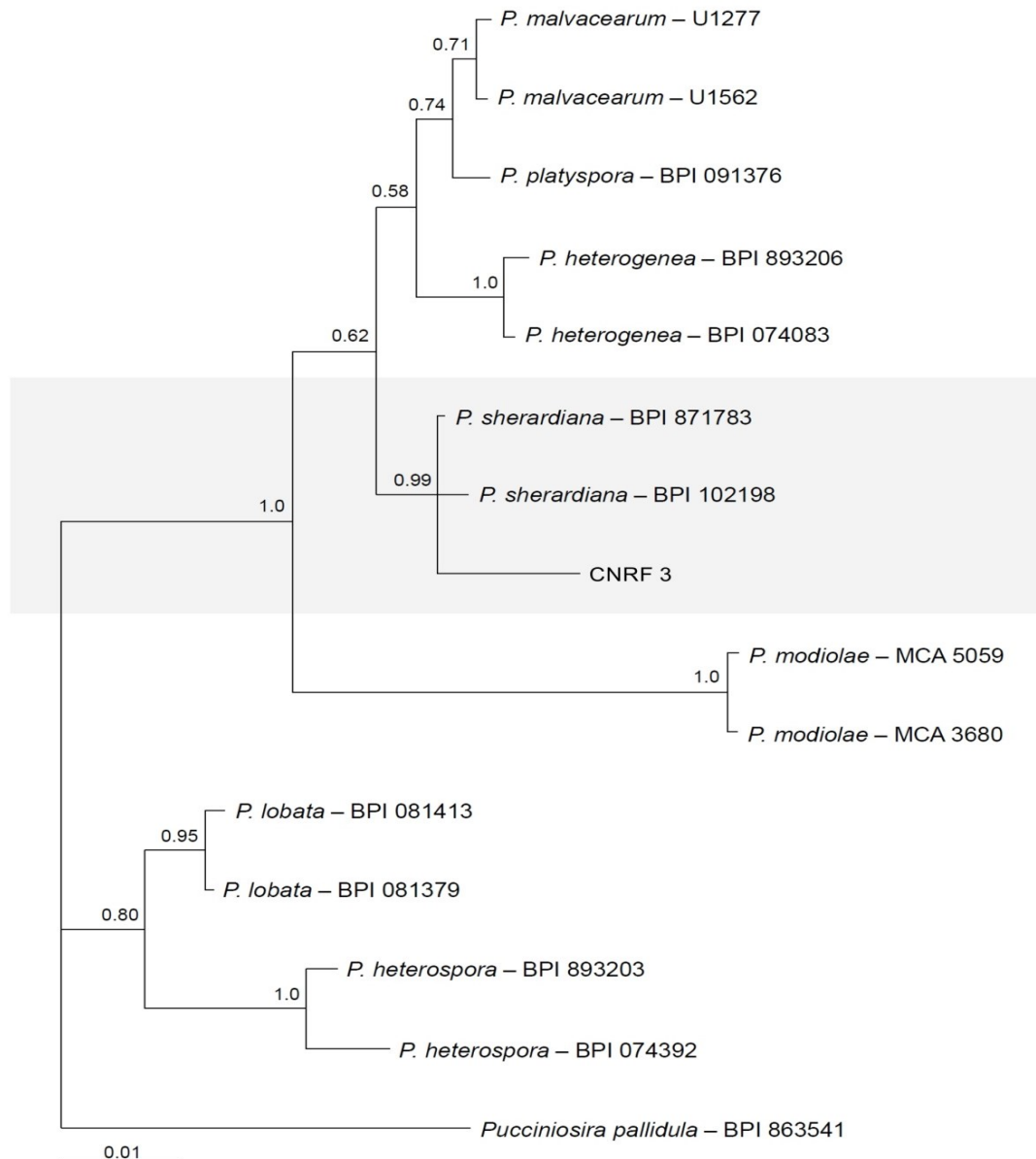


Figure 3. Bayesian tree generated from alignment of partial 28S gene sequences of *Puccinia* species. Bayesian posterior probability values above 0.50 are shown at the nodes. *Puccinosira pallidula* isolate BPI863541 was used as an outgroup.

Figura 3. Árbol Bayesiano generado a partir de alineamiento de secuencias parciales del gen 28S de especies de *Puccinia*. Los valores de probabilidad posterior Bayesianos arriba de 0.50 se muestran en los nodos. El aislado BPI863541 de *Puccinosira pallidula* se usó como grupo externo.

(27-30 μm) by previously mentioned authors for different hosts, such as 30.85 μm in *Sphaeralcea grossulariaefolia* and *S. munroana*, 21-25 μm in *Sidalcea malviflora*, and 18-30 μm in *Alcea rosea*. Briere and Franc (1998) reported the presence of telia on both sides of the leaf in *S. grossulariaefolia* and *S. munroana*. Dugan and Nazaire (2011) observed telia primarily on the adaxial side of leaves of *Sidalcea malviflora*, whereas in this study, they were only found on the abaxial side. Under greenhouse conditions, foliar symptoms were successfully reproduced by inoculating six-week-old *S. angustifolia* plants with *P. sherardiana* teliospores for a period of 15 days, with an average temperature of 22 °C during the day and 18 °C at night. Briere and Franc (1998) completed Koch's postulates in a period of 13 days using 8-week-old plants and temperatures of 20 °C and 15 °C during the day and night, respectively. This work provides the first description of the morphometric characteristics of the pycnia and pycniospores and reports the aecial phase, along with a description of the aecia and aeciospores. It presents the first evidence for a possible reclassification of *P. sherardiana* as a demicyclic rust, rather than microcyclic, as previously reported by Arthur (1962), Briere and Franc (1998), and Dugan and Nazaire (2011), which stated that the rust lacked the aecial and uredinial phases. However, it is still unknown whether it does or does not present the uredinial part.

CONCLUSIONS

P. sherardiana is reported for the first time in Axapusco, State of Mexico. Based on pathogenicity tests, it has been demonstrated that healthy plants inoculated with this rust can develop symptoms and signs similar to those observed in the initial phase. The present study aims to provide insights

más angostas (15.8 μm), respecto al tamaño reportado (27–30 μm) por los autores anteriormente mencionados en diferentes hospedantes, 30.85 μm en *Sphaeralcea grossulariaefolia* y *S. munroana*, 21–25 μm en *Sidalcea malviflora*, y de 18–30 μm en *Alcea rosea*. Con respecto al desarrollo de telios, Briere y Franc (1998) reportaron que están presentes en ambos lados de la hoja en *S. grossulariaefolia* y *S. munroana*. Por su parte, Dugan y Nazaire (2011) observaron telios principalmente en la parte adaxial de hojas de *Sidalcea malviflora*, mientras que en este estudio solo se presentaron en la parte abaxial. Los síntomas foliares son factibles de reproducir mediante la inoculación de plantas de *S. angustifolia* de seis semanas de edad con teliosporas de *P. sherardiana* en condiciones de invernadero y en un período de 15 días con temperatura promedio de 22 °C en el día y 18 °C durante la noche. Por su parte, Briere y Franc (1998) completaron los postulados de Koch en un período de tiempo de 13 días al utilizar plantas de 8 semanas de edad y temperatura de 20 y 15 °C durante el día y noche, respectivamente. Es importante mencionar que en este trabajo se describen por primera vez las características morfométricas de los picnios y picniosporas y se reporta la fase ecial con la respectiva descripción de los ecios y eciosporas, con lo cual se presentan las primeras evidencias para una posible reclasificación de *P. sherardiana* como una roya demicíclica y no microcíclica como se ha reportado anteriormente por Arthur (1962), Briere y Franc (1998) y Dugan y Nazaire (2011) al mencionar que la roya carece de la fase ecial y uredinial. Sin embargo, aún se desconoce si presenta o no la parte uredinial.

CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez a *P. sherardiana* en Axapusco, Estado de México. Las pruebas de

into the life cycle of *P. sherardiana*, specifically focusing on the various stages involved in infecting *Sphaeralcea angustifolia*.

CITED LITERATURE

- Aime MC, Bell CD and Wilson AW. 2018. Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology* 89: 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.002>
- Aime MC, Matheny PB, Henk DA, Frieders EM, Nilsson RH, Piepenbring M, McLaughlin DJ, Szabo LJ, Begerow D, Sampaio JP, Bauer R, Weiss M, Oberwinkler F and Hibbett D. 2006. An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia* 98: 896-905. <https://www.jstor.org/stable/20444779>
- Andrade-Cetto A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.008>
- Arthur JC. 1962. Manual of the rusts in United States and Canada, with supplement by Cummins GB. New York: Hafner Publishing Co. 438 p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19631100420>
- Briere SC and Franc GD. 1998. First report of leaf and stem rust caused by *Puccinia sherardiana* on *Sphaeralcea grossulariaefolia* in North America and *S. munroana* in Wyoming. *Plant Disease* 82: 831. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.831A>
- Calzada F, Basurto JC, Barbosa E, Velázquez C, Hernández NG, Ordoñez-Razo RM, Luna DM and Mulia LY. 2017. Antiprotozoal activities of tiliroside and other compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Pharmacognosy Research* 9: 133-137. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204644>
- Cummins GB and Hiratsuka Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. Third ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, APS Press, St. Paul, MN. 225 p.
- Demers JE, Romberg MK and Castlebury LA. 2015. Microcyclic rusts of hollyhock (*Alcea rosea*). *International Mycological Association Fungus* 6: 477-482. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.11>
- Dugan FM and Nazaire M. 2011. First report of rust of *Sidalcea malviflora* (dwarf checkerbloom) caused by *Puccinia sherardiana* in Washington State. *North American Fungi* 6: 1-5. <https://doi.org/10.2509/naf2011.006.015>
- García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jimenez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA and Meckes-Fischer M. 2012. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11: 468-477. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85624131008.pdf>
- Horst R. 2013. Host Plants. In: Westcott's Plant Disease Handbook. Springer, Dordrecht. 447-699 pp. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2141-8>
- Hotson JW. 1934. Key to the rusts of the Pacific Northwest. University of Washington Publications in Biology 3. University of Washington Press, Seattle. 193 p.
- McVaugh R. 2001. Ochnaceae to Loasaceae. In: Anderson WR (ed.). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 3. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Romero-Cerecero O, Meckes-Fischer M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer JE, Nicasio-Torres P, Pérez-García D and Tortoriello J. 2013. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology* 147: 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>
- Rzedowski GC de and Rzedowski J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. 1406 p.
- Sampangi R, Aime MC, Mohan K and Shock C. 2010. New and re-emerging rust diseases from Idaho and Oregon. *Phytopathology* 100: S113.
- Toome-Heller M. 2016. Latest Developments in the Research of Rust Fungi and Their Allies (Pucciniomycotina). In: Li DW, ed. *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. Springer Publishing Switzerland. 147-168 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_7
- Vilgalys R and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~