



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES**

ÁREA TEMÁTICA: Interacción planta-microorganismo-insecto

**COINFECCIÓN E INTERACCIÓN GENÉTICA DE *Fusarium* sp. Y
Fusarium mexicanum EN ÁRBOLES DE MANGO (*Mangifera
indica* L.)**

**TESIS QUE PRESENTA
BIOL. ISAÍ BETANCOURT RESENDES**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Asesor: Doctor of Philosophy. Gerardo Rodríguez Alvarado

Co-asesora: Doctor of Philosophy. Sylvia Patricia Fernández Pavía



Morelia, Michoacán, agosto de 2013

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado y co-asesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía. Se agradece el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica, UMSNH, Proyecto 6:10, 2010, 2011. También se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de esta investigación, a través del financiamiento del proyecto No. 84578, Convocatoria 2007 SEP-CONACYT.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo no se habría podido realizar sin la generosa colaboración de muchas personas a quienes expreso mis más sinceros agradecimientos.

Primeramente darle gracias a Dios por haberme ayudado hasta el día de hoy, colmándome de su Gracia, ciencia y sabiduría para la conclusión de este estudio.

Al Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado director de este trabajo, por su valiosa guía, apoyo, consejos y sugerencias, por darme la oportunidad de colaborar con él en este trabajo que redundó en mi beneficio.

A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía por su sincero apoyo y sus valiosas aportaciones en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité revisor: al Dr. Javier Villegas Moreno, al Dr. Miguel Martínez Trujillo, al Dr. Joaquín Velázquez Monreal, a la Dra. Sylvia P. Fernández Pavía y al Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, por sus valiosas aportaciones, consejos y apoyo para enriquecer la calidad del trabajo.

A mi hija: Amísadaí Betancourt E. por su cariño, ternura y por su apoyo ya que se ha convertido en una inspiración muy grande para seguir adelante.

A mis padres: José Luis Betancourt Castañeda y Nelva Resendes Reyes, por el apoyo incondicional que me han dado a través de toda mi vida estando siempre conmigo en los momentos agradables y momentos tristes y por que son parte importante en este logro.

A mis Hermanos: Jocabed, Esther, Isaac y Rud Betsabé por mostrarme su cariño y respeto.

A mis tíos: Rafael Valencia Valencia y María Luisa Betancourt Castañeda, por haberme apoyado durante mis estudios brindándome su hogar incondicionalmente.

A Isidro R. Valencia Betancourt. Por ayudarme en muchos aspectos de mi formación académica.

A mi amigo: Alejandro Soto Plancarte, por brindarme su amistad y compartir buenos y malos momentos conmigo.

A mis compañeros del Laboratorio: Ana Luisa, Carmen Quezada Gutierrez, Nuría Gómez Dorantes, Marlene Díaz Celaya, Rosario Gregorio Cipriano, por brindarme su apoyo durante la realización de este trabajo.

El principio de la sabiduría es el temor a Jehová; Los insensatos desprecian la sabiduría y la enseñanza. Proverbios 1:7

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Origen y distribución del mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	5
<i>Fusarium</i> agente causal de la malformación del mango	5
Heterocariosis y Parasexualidad	7
Coinfección de hongos patógenos en plantas	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	10

CAPITULO I. COINFECCIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* EN ÁRBOLES DE MANGO (*Mangifera indica* L) CON MALFORMACIÓN

RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1.1 INTRODUCCIÓN	14
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	16
1.2.1 Localización del área de estudio	16
1.2.2 Procesamiento de las muestra. Aislados.	18
1.2.3 Obtención de cultivos monospóricos. Preservación de los aislados	18
1.2.4 Caracterización cultural	19
1.2.5 Caracterización morfológica	19
1.2.6 Caracterización genética	19
1.2.6.1 Extracción de ADN	19
1.2.6.2 Amplificación de ADN	20
1.3 RESULTADOS	21
1.3.1 Colima. Colectas	21

1.3.2 Colima. Caracterización cultural	24
1.3.3 Colima. Caracterización morfológica	24
1.3.4 Colima. Caracterización genética	24
1.3.5 Jalisco. Colectas	25
1.3.6 Jalisco. Caracterización cultural	25
1.3.7 Jalisco. Caracterización morfológica	25
1.3.8 Jalisco. Caracterización genética	27
1.4 DISCUSIÓN	28
1.5 CONCLUSIONES	31
1.6 LITERATURA CITADA	32

CAPITULO II. COINFECCIÓN ENTRE *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* EN PLANTAS DE MANGO

RESUMEN	35
ABSTRACT	36
2.1 INTRODUCCIÓN	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1 Cepas utilizadas en los experimentos	39
2.2.2 Inóculo	39
2.2.3 Plantas de mango	39
2.2.4 Inoculación	39
2.2.5 Tratamientos	40
2.2.6 Análisis de las plantas inoculadas	40
2.2.7 Aislados de <i>Fusarium</i> . Diluciones seriadas	40
2.2.8 Caracterización cultural	41
2.2.9 Caracterización genética	41
2.2.9.1 Extracción de ácidos nucleicos	41
2.2.9.2 Amplificación de ADN	42
2.2.9.3 Análisis Blast	42
2.3 RESULTADOS	43
2.3.1 Colecta 1	43

2.3.2 Colecta 2	45
2.3.3 Caracterización genética de los aislados obtenidos	45
2.3.3.1 Colecta 1	45
2.3.3.2 Colecta 2	47
2.4 DISCUSIÓN	48
2.5 CONCLUSIONES	50
2.6 LITERATURA CITADA	51

CAPITULO III. HETEROCARIOSIS *in planta* por *Fusarium mexicanum*.

RESUMEN	54
ABSTRACT	56
3.1 INTRODUCCIÓN	57
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.2.1 Localidad	59
3.2.2 Cepas mutantes y silvestres de <i>F. mexicanum</i>	59
3.2.3 Obtención de inóculo	60
3.2.4 Plantas de mango	60
3.2.5 Experimento: Inoculación de mutantes <i>nit</i> de <i>F. mexicanum</i> en plantas de mango	60
3.2.6 Recuperación de las cepas inoculadas de las plantas de mango con síntomas de malformación	61
3.2.7 Caracterización fenotípica de las cepas obtenidas	61
3.3 RESULTADOS	63
3.3.1 Experimento. Repetición 1	63
3.3.1.1 Sintomatología de las plantas inoculadas	63
3.3.1.2 Aislados recuperados de los tejidos malformados	64
3.3.2 Experimento. Repetición 2	65
3.4 DISCUSIÓN	67
3.5 CONCLUSIONES	69
3.6 LITERATURA CITADA	70
DISCUSIÓN GENERAL	72

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	74
LITERATURA COMPLEMENTARIA	75
ANEXOS	78
Anexo I. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	78
Anexo II Aislamiento de <i>Fusarium</i> de tejido de mango con malformación. Obtención de un aislamiento por muestra	80
Anexo III Aislamiento de <i>Fusarium</i> de tejido de mango con malformación. Obtención de aislamientos por diluciones seriadas	81
Anexo IV Características morfológicas de macroconidios y microconidios de aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de árboles de mango con malformación en Colima	82
Anexo V Características morfológicas en CLA de aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de árboles de mango con malformación en Jalisco	83
Anexo VI Análisis Blast para aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de árboles de mango con malformación en Colima	84

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resultados del experimento 1. Aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejido asintomático de plantas de mango inoculadas individualmente o en mezclas, con <i>Fusarium</i> sp. MXCOL-113 y <i>F. mexicanum</i> MXCOL-101.	44
Cuadro 2. Análisis BLAST de los aislados obtenidos de plantas asintomáticas de mango, inoculadas con cepas de <i>Fusarium</i> sp. MXCOL-113 y <i>F. mexicanum</i> .	46
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento.	61
Cuadro 4. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>nit</i> en MM con diversas fuentes de nitrógeno.	62
Cuadro 5. Resultados de la coinoculación de cepas mutantes de <i>F. mexicanum</i> en plantas de mango. Caracterización fenotípica de los aislados obtenidos de plantas con síntomas de malformación.	65

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Sitios de muestreo en huertos comerciales de mango en los estados de Colima y Jalisco.	17
Figura 2. Síntomas de malformación en árboles de mango, variedad Tommy Atkins, en la localidad San Rafael, Tecomán, Colima.	23
Figura 3. Características morfológicas en medio CLA de aislados de <i>F. mexicanum</i> obtenidos de tejidos malformados de mango en Jalisco.	26
Figura 4. Plantas de mango inoculadas con cepas silvestres y mutantes <i>nit</i> de <i>F. mexicanum</i> .	64
Figura 5. Comparación del tipo de crecimiento del micelio entre mutante <i>nit1</i> MXJAL-3.14 y la cepa silvestre MXJAL-3, de <i>F. mexicanum</i> , en medio con NaNO ₃ .	66

CO INFECCIÓN E INTERACCIÓN GENÉTICA DE *Fusarium* sp. y *Fusarium mexicanum* EN ÁRBOLES DE MANGO (*Mangifera indica* L.)

RESUMEN GENERAL

La malformación del mango es considerada una de las enfermedades más severas que atacan a este cultivo. Diversas especies de *Fusarium* han sido reportadas como el agente causal de este problema a nivel mundial. En México se ha detectado a *F. mexicanum* como el patógeno con mayor distribución en las regiones productoras de mango. Además, se han encontrado también otros taxones, como *Fusarium* sp. # 4 y *F. pseudocircinatum*, en Campeche, Colima y Guerrero. Aun cuando se han identificado varias especies del hongo en una misma localidad, se desconoce el tipo de interacción que existe entre los taxones. El objetivo del presente trabajo fue determinar si ocurre coinfección e interacción genética de *Fusarium* sp. en árboles de mango con malformación y en plantas inoculadas.

Se muestrearon huertas comerciales en los estados de Colima y Jalisco. Los aislados obtenidos se caracterizaron cultural, genética y morfológicamente. En Colima se obtuvieron 67 aislados. De los cuales 54 resultaron ser *F. decemcellulare* y otros 14 se identificaron como *F. pseudocircinatum*. En Jalisco todos los aislados fueron *F. mexicanum*. Además se detectó la presencia de *F. decemcellulare* y *F. pseudocircinatum* infectando árboles de mango en una huerta en Tecomán, Colima. En una muestra de tejido con malformación vegetativa de un árbol se encontró coinfección de ambas especies de *Fusarium*.

Las cepas patogénicas *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* MXCOL-101, se inocularon individualmente y en combinación, en yemas en dormancia de plantas de mango var. Kent de 2 años de edad. Los tejidos inoculados se analizaron a los cinco y siete meses post inoculación. El análisis genético de los aislados obtenidos de los tejidos inoculados mostró que los recuperados no correspondían con los inoculados inicialmente. Se detectó a *Fusarium* sp. y a *F. pseudocircinatum* como contaminantes de las plantas utilizadas en el experimento.

También se inocularon mutantes *nit1* y *nnu* de *F. mexicanum* en plantas de mango criollo de un año de edad. Las inoculaciones se realizaron con las cepas de manera individual y en combinación. A los cuatro meses post inoculación,

algunas de las plantas mostraron síntomas de malformación vegetativa, se hicieron aislados en medio mínimo y se caracterizaron fenotípicamente. Se recuperaron aislados mutantes *nit1* y *nnu* de las inoculaciones individuales. En tanto que de las plantas donde se coinocularon ambos fenotipos se obtuvieron aislados con fenotipo silvestre (posiblemente micelio heterocarión) y de fenotipos *nit1*.

Se detectó coinfección por *F. decemcellulare* y *F. pseudocircinatum* en un mismo tejido de mango con síntomas de malformación vegetativa. Esto indica que diferentes especies de *Fusarium* son capaces de cohabitar de manera natural en árboles de este frutal. La inoculación de mutantes *nit* en yemas en dormancia de mango y la recuperación de aislados con micelio tipo silvestre sugieren la posibilidad de anastomosis y la formación de heterocariones *in planta*. Estos resultados sugieren que podrían estar ocurriendo diferentes tipos de interacciones en árboles de mango entre diversos taxones de *Fusarium*.

GENERAL ABSTRACT

Mango malformation is the most severe disease of this crop. *Fusarium* has been reported as the causal agent of this disease worldwide. *F. mexicanum* has been detected as the pathogen with a broad distribution in Mexico. Other two *Fusarium* species, such as *Fusarium* sp. # 4 y *F. pseudocircinatum* have been detected in Campeche, Colima and Guerrero. Even when several *Fusarium* species have been detected in one location, it is not known the type of interaction that may occur among the fungal species. The objective of this work was to determine if co-infection and genetic interaction of *Fusarium* sp. occur in mango trees with malformation and on inoculated plants.

Commercial mango orchards were sampled in the states of Colima and Jalisco, Mexico. The fungal isolates obtained were characterized cultural, genetic and morphologically. In Colima two *Fusarium* species were identified; *F. decemcellulare* presented 54 isolates and *F. pseudocircinatum* showed 14 isolates. In Jalisco, all the fungal isolates were identified as *F. mexicanum*. Also *F. decemcellulare* and *F. pseudocircinatum* were detected infecting mango trees in one orchard in Tecoman, Colima. In one sample of mango with vegetative malformation, both *Fusarium* species were found co-infecting the malformed tissue.

The pathogenic strains *Fusarium* sp. MXCOL-113 and *F. mexicanum* MXCOL-101, were inoculated individually and mixed in dormant buds of plants of mango cv. Kent of two years of age. The analysis of the inoculated tissue was carried out five months post inoculation. The genetics analysis of the fungal isolates obtained from the inoculated tissue showed that the recovered isolates did not correspond to the isolates that initially were inoculated. *Fusarium* sp. and *F. pseudocircinatum* were detected in the plants that were used in this experiment.

F. mexicanum mutants *nit1* and *nnu* were inoculated alone or mixed in mango plants one year old. Four months post inoculations some plants showed symptoms of vegetative malformation. Reisolation of the inoculates mutants was carried out on minimum media. The *Fusarium* isolates that were obtained were phenotypically characterized. Mutants *nit1* and *nnu* were recovered from individual inoculations. Wild phenotypic isolates (heterokaryon mycelium) and mutant *nit1* isolates were recovered from plants inoculated with a combination of mutant strains.

A mixed infection with *F. decemcellulare* and *F. pseudocircinatum* was detected in field samples from mango malformed tissue from Colima. This indicates that different species of *Fusarium* are able to cohabit in a natural way in mango trees. The inoculation of a mixture of complementary *nit* mutants in mango dormant buds, and the recovery of wild type *Fusarium* isolates suggests that anastomosis and the formation of heterokaryons may occur *in planta*. These results indicate that different types of interactions could be happening in mango trees among different *Fusarium* species.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Origen y distribución del mango (*Mangifera indica* L.).

Existen un gran número de especies de *Mangifera* en Indonesia en el archipiélago malayo, Tailandia y Filipinas. Por lo tanto el mango ha sido un cultivo muy importante en Asia. El origen de esta especie tuvo su origen en el sur de Asia en el archipiélago malayo donde se han generado un gran número de variedades cultivadas de este frutal (Mukherjee y Litz, 2009). Existen dos tipos de mango en base a su modo de reproducción. Los que presentan semillas monoembrionicas que probablemente tuvieron su origen en India y las que poseen semillas poliembrionicas que proceden del sur y este de Asia (Kumar *et al*, 2011).

El mango se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En India se ha cultivado por más de 4,000 años. Este frutal pudo ser introducido al continente Africano desde Arabia y Persia en el siglo X y más tarde los portugueses lo introdujeron a Brasil y a las colonias africanas de Angola y Mozambique. Los pobladores filipinos cruzaron el Océano Pacífico e introdujeron mangos poliembrionicos en las colonias del nuevo mundo (Mukherjee y Litz, 2009).

La superficie establecida de mango en México se concentra en los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz, (SIAP-SAGARPA, 2011). Los rendimientos que se obtienen en las diferentes regiones del país varían. Así, mientras que en Guerrero se tiene un promedio de 13.47 ton/ha, en Michoacán éste es de 6.15 ton/ha (SIAP-SAGARPA, 2011). La producción de esta especie frutal en México se ve afectada por diversos factores incluyendo una alta incidencia de enfermedades (Chávez *et al*. 2001). Aquellas causadas por hongos son la principal limitante para el desarrollo del cultivo, ya que éstas afectan a todos los tejidos y fases de desarrollo del mismo (Ploetz y Freeman, 2009).

***Fusarium* agente causal de la malformación del mango.**

La malformación del mango, es considerada como una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo (Ploetz, 2001). Los síntomas incluyen malformación de brotes florales y de brotes vegetativos, los cuales en conjunto reducen el desarrollo de follaje y producción de fruto (Ploetz y Freeman, 2009). Esta enfermedad se presenta en la mayoría de las áreas

productoras de mango en el ámbito mundial (Kumar *et al.* 1993). Varias especies del hongo *Fusarium* han sido reportadas como causantes de este problema (Marasas *et al.* 2006). *F. mangiferae* ha sido detectada en África del Sur, Egipto, España, Florida (USA), India, Israel, Malasia y Omán (O'Donnell *et al.* 1998; Steenkamp *et al.* 2000; Britz *et al.* 2002; Zheng y Ploetz, 2002). *F. sterilihyphosum* se ha encontrado presente en África del Sur y Brasil (Britz *et al.* 2002; Ploetz, 2003; Lima *et al.* 2009). *F. proliferatum* ha sido reportado recientemente en China (Zhan *et al.* 2010). Un taxón de *Fusarium* ha sido detectado en Brasil descrito formalmente como *F. tuiense* sp. nov. (Lima *et al.* 2012). Recientemente, un nuevo taxón del hongo ha sido detectado causando malformación en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Betancourt-Resendes *et al.* 2013), el cual ha sido descrito formalmente y se le ha denominado *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010). Un taxón adicional de *Fusarium* ha sido encontrado asociado con tejidos malformados de mango en Colima, y para el cual las pruebas de patogenicidad han sido positivas (Quezada-Gutiérrez, 2011). Este último taxón es similar morfológicamente a *F. mexicanum* y *F. sterilihyphosum* y ha mostrado diferencias con ambas especies en varios análisis filogenéticos (Otero-Colina *et al.* 2010; Quezada Gutiérrez, 2011).

Las especies y taxones de *Fusarium* que han sido reportados como causantes o en asociación con síntomas de malformación del mango, están agrupados en un complejo de especies del teleomorfo *Gibberella fujikuroi*. Aun cuando no se ha detectado el estado sexual para las especies descritas como causantes de la malformación del mango, la agrupación en el complejo *G. fujikuroi* se ha basado en estudios morfológicos y filogenéticos. Únicamente en aislados de *F. proliferatum* detectados en Malasia se ha encontrado a *G. intermedia* como estado sexual (Leslie, 1995). Los caracteres morfológicos que se utilizan son principalmente la forma y tamaño del macroconidio y microconidio. Otros caracteres de este tipo importantes son el arreglo aéreo de los microconidios, morfología de las células conidiógenas y la presencia o ausencia de clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006; Kvas *et al.* 2009). Sin embargo, el uso de caracteres morfológicos para separar especies en este complejo no ha sido muy útil, ya que son pocos los caracteres utilizables (Kvas *et al.* 2009) y morfológicamente los taxones son muy parecidos. El análisis filogenético empleando regiones de genes nucleares y del ADN ribosomal, en

complementación del análisis morfológico y genético, ha sido muy favorable para establecer nuevas especies dentro del complejo *G. fujikuroi* (Kvas *et al.* 2009).

Heterocariosis y parasexualidad.

Heterocariosis se refiere a la ocurrencia de núcleos genéticamente diferentes en una hifa o micelio. Esta situación se puede presentar debido a una mutación en un núcleo residente o como resultado de anastomosis de hifas seguido por migración de los núcleos de una de las hifas hacia la otra, o por intercambio de núcleos entre las dos hifas. Involucra la anastomosis de hifas y luego ocurre la fusión de núcleos (formación de un núcleo diploide) de las dos cepas involucradas, llevándose a cabo una recombinación mitótica y formación posterior de núcleos haploides cuando los cromosomas se segregan. Se ha considerado que la ocurrencia de heterocariosis y parasexualidad podría explicar la variación observada en poblaciones de hongos anamórficos y otros hongos que no presentan reproducción sexual (Burnett, 2003). Algunos investigadores consideran que la importancia de estos procesos en la naturaleza es baja o escasa aunque en algunos hongos en los que es relativamente fácil forzar la formación de heterocariones en el laboratorio, en campo no han sido detectados. Lo anterior es tomado como un sólido argumento en contra de la ocurrencia natural de heterocariones (Caten y Jinks, 1966). El descubrimiento de que solamente aislados compatibles vegetativamente o somáticamente pueden anastomosarse, reduce aún más la probabilidad de encontrar heterocariones en la naturaleza.

Coinfección de hongos patógenos en plantas.

Los estudios de aislados de patógenos causando coinfección en plantas hospedantes son escasos debido a la ausencia de marcadores que distingan aislados individuales. Adachi y Tsuge (1994) mostraron evidencia de la ocurrencia de coinfección por dos aislados en lesiones individuales de la mancha negra del peral causada por *Alternaria alternata*. Los autores encontraron dos tipos de ADN ribosomal en aproximadamente un 20% de aislados obtenidos de lesiones individuales, demostrando que algunos de éstos estaban conformados por una mezcla de dos aislados distinguibles por su tipo de ADN ribosomal (Adachi y Tsuge, 1994). No debe descartarse la posibilidad de que la mezcla de ADN

ribosomal resulte de la recombinación en cualquiera de los dos ciclos, asexual o sexual (Adachi y Tsuge, 1994). Por otra parte, la ocurrencia de coinfección por aislados de *Mycosphaerella graminicola* en lesiones individuales de hojas de trigo, fue demostrada utilizando un análisis para detectar marcadores por RFLP (McDonald y Martínez, 1990). Además de la detección de algunos casos de coinfección por patógenos de plantas, también se ha encontrado la presencia de aislados no patogénicos en lesiones causadas por aislados que sí lo son (Adachi y Tsuge, 1994).

El uso de cepas auxótrofas en estudios de laboratorio sobre heterocariosis ha sido criticado debido a que se considera que la mayoría de los hongos patógenos de plantas no son deficientes nutricionalmente (MacNeill y Chilton, 1981). Ante esto se generaron cepas resistentes a benomil o cicloheximida para no usar cepas auxótrofas, en un estudio sobre la habilidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de llevar a cabo intercambio genético durante su asociación *in vitro* e *in planta*. Los resultados indicaron la posible recombinación de los marcadores químicos entre las cepas utilizadas (MacNeil y Chilton, 1981).

No se han realizado estudios sobre la interacción en campo de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango. Aun cuando se han detectado dos taxones de este hongo causando malformación en algunas regiones productoras de este frutal en el ámbito mundial (Lima *et al.*, 2009, Quezada-Gutierrez 2011), se desconoce si ocurre interacción entre dichos taxones. La presencia de dos taxones de *Fusarium* causantes de malformación del mango en Colima, representa una opción para estudiar la posible coinfección de estas dos especies en plantas de ese cultivo.

HIPÓTESIS

- Diferentes especies de *Fusarium* coinfectan árboles de mango con malformación.
- Las especies de *Fusarium* que coinfectan plantas de mango intercambian información genética vía heterocariosis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si ocurre coinfección e interacción genética de *Fusarium* sp. en árboles de mango con malformación en campo y en plantas inoculadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si diferentes especies de *Fusarium* coexisten en árboles de mango con malformación en huertas de mango.
- Establecer si sucede coinfección en plantas de mango inoculadas con aislados de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum*.
- Determinar si ocurre heterocariosis *in planta* con mutantes nitrato reductasa de *F. mexicanum*.

CAPITULO I

COINFECCIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* EN ÁRBOLES DE MANGO CON MALFORMACIÓN

RESUMEN

Diversas especies de *Fusarium* causan la enfermedad malformación del mango en el ámbito mundial. Se han detectado más de una especie de este hongo en algunas zonas productoras de mango. Se desconoce si ocurren interacciones entre especies del patógeno en los tejidos malformados de árboles de este frutal en campo. El objetivo del trabajo fue determinar si diferentes especies de *Fusarium* coexisten en tejidos malformados de mango. Se realizaron colectas de este tipo de tejido en huertos comerciales de los estados de Colima y Jalisco. Se obtuvieron aislados y se preservaron como cultivos monospóricos. Los aislados se caracterizaron culturalmente y morfológicamente. Se identificaron por medio de PCR amplificando secuencias del gen factor de elongación y análisis Blast. Los aislados resultantes de Colima se dividieron en dos grupos de acuerdo a sus características. Un grupo de 13 aislados presentó conidios en falsas cabezas, tamaño promedio del macroconidio de 37.9 x 3.8 μm , y micelio denso de color blanco a amarillo ligero, sin pigmentación en el medio. Un segundo grupo de 16 aislados mostró conidios en cadena, tamaño promedio del macroconidio de 87.15 x 8.2 μm , y micelio de color blanco a crema, con pigmentación roja en el medio. Los 30 aislados de muestras de Jalisco tuvieron características muy similares: conidios en falsas cabezas en mono y polifiálides, tamaño promedio del macroconidio de 43.89 x 5.65 μm , en algunos aislados se observaron hifas enrolladas estériles, tuvieron abundante micelio aéreo color blanco a púrpura y pigmentación del medio de color amarillo ligero a violeta ligero. El análisis Blast para las secuencias de los aislados obtenidos en Tecomán, Colima, indicó que un grupo corresponde a *F. pseudocircinatum*; mientras que el otro grupo pertenece a *F. decemcellulare* (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*). También este análisis para las secuencias de los aislados obtenidos en Jalisco mostró identidad con cepas de *F. mexicanum* colectado en Michoacán y Jalisco, previamente estudiadas. El hallazgo de *F. pseudocircinatum* y *F. decemcellulare* infectando un mismo árbol en una huerta comercial de mango en Tecomán, Colima, indica que

dos especies de *Fusarium* pueden coexistir en tejidos de mango con malformación en el campo.

ABSTRACT

Several *Fusarium* species cause mango malformation around the world. More than one *Fusarium* species have been detected in some mango producing areas. It is unknown if interactions among these *Fusarium* species occur in the malformed tissues of the mango trees in the field. The objective of this work was to determine if different *Fusarium* species coexist in mango malformed tissues. Sampling of mango tissue with malformation was carried out in commercial orchards in the states of Colima and Jalisco. *Fusarium* isolates were obtained and preserved as monosporic cultures. These isolates were cultural and morphological characterized. They were identified by PCR amplification of sequences of the elongation factor gene and Blast analysis. The isolates obtained from Colima were divided into two groups according to their characteristics. One group of 13 isolates showed conidia in false heads, macroconidia with an average size of 37.9 x 3.8 μm , dense mycelia, white to light yellow color, without pigmentation in the media. A second group of 16 isolates presented microconidia in chains, macroconidia with an average size of 87.15 x 8.2 μm , mycelia white to cream color, with red pigmentation in the media. All 30 isolates from Jalisco showed similar characteristics; conidia in false heads in mono and polyphialides, macroconidia with an average size of 43.89 x 5.65 μm , in some isolates, coiled hyphae were observed, abundant white to violet mycelia, with light yellow to light violet media pigmentation. Blast analysis for the sequences of the isolates obtained from Tecoman, Colima, showed that one group corresponds to *F. pseudocircinatum*; meanwhile, the other group corresponds to *F. decemcellulare* (teleomorph *Albonectria rigidiuscula*). Blast analysis for the sequences of the isolates obtained in Jalisco showed identity with strains of *F. mexicanum* collected in Michoacán and Jalisco, previously studied. The finding of isolates *F. pseudocircinatum* and *F. decemcellulare* infecting the same tree in a commercial mango orchard in Tecoman, Colima, indicates that two *Fusarium* species can coexist in malformed mango tissues in the field.

1.1 INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutícolas más importantes en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Ploetz, 2001). México ocupa el cuarto lugar en producción del mismo a nivel mundial. Siendo los principales estados productores Guerrero, Nayarit, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán y Veracruz (SIAP, 2012). Sin embargo, existen varias enfermedades que limitan la producción de mango. Una de ellas conocida como malformación del mango es de las más serias en este cultivo disminuyendo la producción hasta en un 70 % (Noriega, 1996). Los síntomas se presentan como deformación en brotes vegetativos y florales afectando el desarrollo de follaje y fruto (Ploetz, 2001). En México se ha detectado la enfermedad en todas las zonas donde se cultiva el mango (Prieto *et al.* 2005).

En los años 60s y 70s del siglo pasado investigadores en la India completaron los postulados de Koch para la malformación del mango. Mostraron evidencia de que un hongo identificado en ese entonces como *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* causaba la malformación floral (Summanwar *et al.* 1966) y vegetativa (Varma *et al.* 1974). Posteriormente, Freeman *et al.* (1999) inocularon cepas de *Fusarium* tipo 'subglutinans', aisladas de tejido malformado de mango, transformadas con GUS (β -gluconoridase) en plantas del mismo cultivo. Los síntomas típicos de la enfermedad aparecieron en brotes vegetativos y florales. El micelio transformante se observó en los órganos de las plantas infectadas, confirmando que *Fusarium* es el agente etiológico de la enfermedad. Steemkamp *et al.* (2000) analizaron filogenéticamente 18 cepas de *F. subglutinans* aisladas de tejidos malformados de mango en diferentes áreas productoras del mundo, utilizando dos genes nucleares (Histona H3 y β Tubulina). El análisis mostró dos grupos filogenéticamente distintos. Para un grupo de doce cepas obtenidas en África del Sur, Israel y los Estados Unidos, se propuso el nombre de *F. mangiferae* (Britz *et al.* 2002). El segundo grupo estuvo representado por seis cepas de África del Sur, para el cual se sugirió el nombre de *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.* 2002). Otras especies del género *Fusarium* han sido reportadas como agentes causales de la enfermedad (Marasas *et al.* 2006; Lima *et al.* 2012). En México se han detectado varias especies de *Fusarium* asociadas a la malformación de mango, siendo *F. mexicanum* la especie

comúnmente encontrada en la región centro occidente de México (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Otero-Colina *et al.* 2010).

Aun cuando se ha identificado más de una especie de *Fusarium* causando malformación en un mismo país (Lima *et al.* 2009, 2012; Quezada-Gutiérrez, 2011), se desconoce si pueden ocurrir en una misma huerta de mango, y en un mismo árbol. Por lo anterior, no se tiene información sobre interacción entre especies patogénicas del mango en campo. El objetivo de este trabajo fue determinar si diferentes especies de *Fusarium* coexisten en tejidos malformados de este cultivo en esas condiciones.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Localización del área de estudio

El área de estudio comprendió las zonas productoras de mango de la región costera del Pacífico mexicano en los estados de Colima y Jalisco (Fig. 1).

Sitio 1: Se localiza en el Km. 36 de la carretera Colima-Manzanillo, predio San Rafael que pertenece al municipio de Tecomán, Colima. La variedad cultivada de mango es Tommy Atkins, con árboles de 6 años de edad y 4 metros de altura. Se observaron síntomas atípicos de malformación vegetativa.

Sitio 2: Se encuentra en el ejido La Concepción, predio Agua Caliente en el municipio de La Huerta, Jalisco. La variedad cultivada de mango es Kent, con árboles de 13 años de edad y 6 metros de altura. Se encontraron síntomas de malformación floral y escasa malformación vegetativa.

Sitio 3: Se ubica en el ejido La Concepción, predio El Palmar del municipio de La Huerta, Jalisco. La variedad fue Kent, con árboles de 13 años de edad y 6 metros de altura que presentaban síntomas de malformación floral y escasa malformación vegetativa.

Sitio 4: En el ejido Villa Obregón que pertenece al municipio de Cihuatlán, Jalisco. Árboles de mango de la variedad Keit, con árboles de 7 años de edad, rehabilitado y con una altura de 5 metros. Se observaron síntomas de malformación vegetativa y floral.

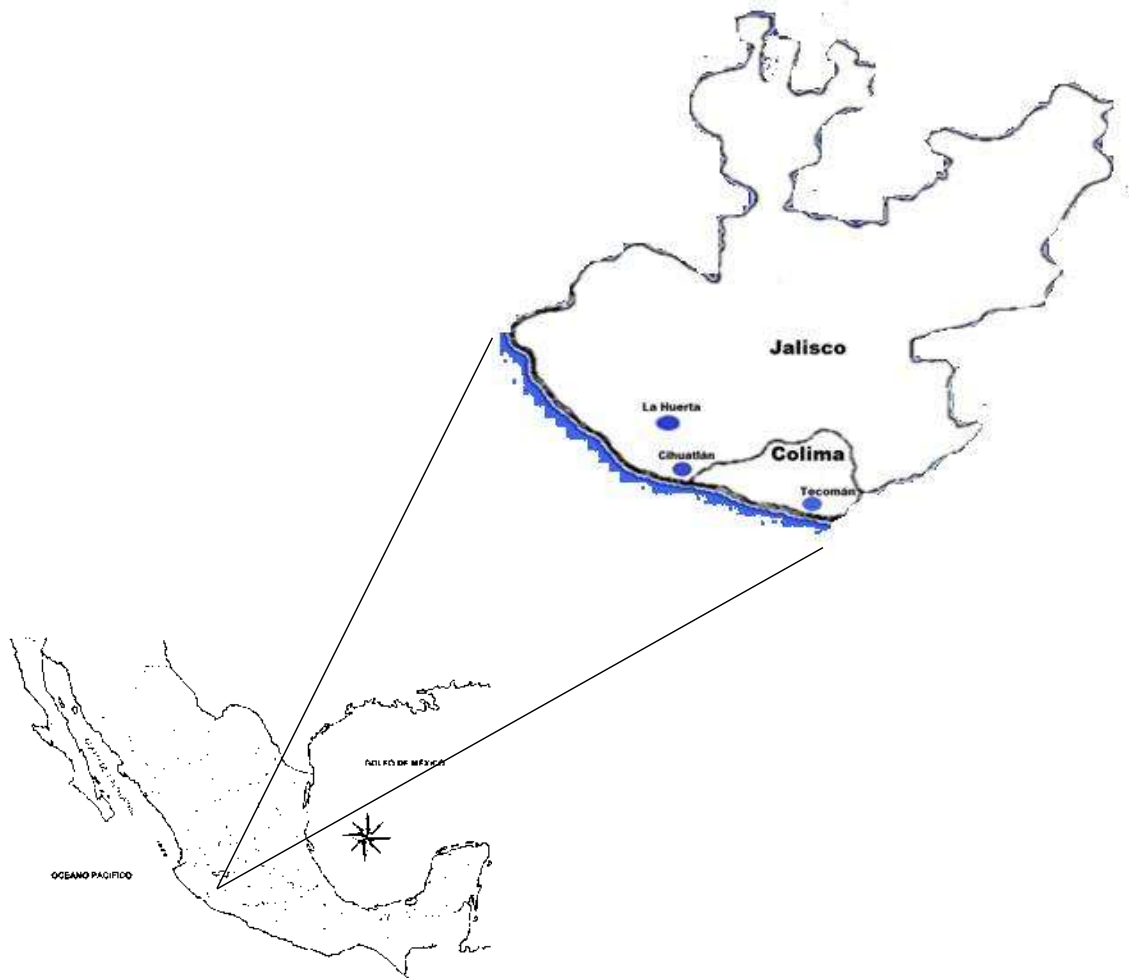


Figura 1. Áreas de muestreo en huertos comerciales de mango en los estados de Colima y Jalisco.

1.2.2 Procesamiento de las muestras. Aislados.

De cada árbol seleccionado se obtuvo una muestra de tejido con malformación vegetativa y/o malformación floral. En el laboratorio se procesó una muestra de aproximadamente 5 cm², de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo II. Los explantos se sembraron en cajas con medio PDA diluido suplementado con antibióticos (Anexo I) y se incubaron a temperatura ambiente en obscuridad. Las colonias fungosas emergidas del tejido que presentaron crecimiento típico de *Fusarium* fueron transferidas por punta de hifa a cajas con medio SNA (Anexo I), un aislado por muestra y se incubaron a 24 °C ± 1 bajo luz blanca y negra con un fotoperiodo de 12 horas.

Para obtener más de un aislado de *Fusarium* por muestra, los tejidos de ésta se procesaron de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo III. De cada muestra se transfirieron un mínimo y un máximo de 10 y 20 colonias, respectivamente.

1.2.3 Obtención de cultivos monospóricos. Preservación de los aislados

A partir de cada uno de los cultivos en SNA generados y que se describe en la sección anterior, se tomaron 3 discos de 3 mm y se colocaron en tubos con 5 mL de agua estéril. Éstos se agitaron manualmente para obtener una suspensión de conidios 10⁰. Y de ésta se tomaron 500 µL para hacer diluciones seriadas 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³. De cada dilución se tomaron 25 µL y se colocaron en el centro de una caja de Petri 100 x 15 mm con agar agua al 2 % (Anexo I). La suspensión de conidios se distribuyó en las cajas con una varilla de vidrio estéril y se incubaron a 24 °C ± 1 en obscuridad.

Dos colonias emergidas, preferentemente de la dilución 10⁻³, fueron transferidas por punta de hifa a cajas de Petri con SNA. Los cultivos se incubaron a 24 °C ± 1 bajo luz blanca y negra, con un fotoperiodo de 12 horas durante 10 días. Discos de 3 mm de medio con micelio se pasaron a dos microtubos etiquetados, con 1 mL de agua destilada estéril y se almacenaron a 4 °C. A una segunda caja de cada cultivo se le agregaron 2 mL de una solución estéril de glicerol al 25 % para obtener una suspensión de conidios, la cual fue transferida a dos tubos criogénicos etiquetados y se almacenaron a -70 °C.

1.2.4 Caracterización cultural

Se inocularon 15 µL de una suspensión de conidios almacenada a 4 °C en cajas 60 x 15 mm con medios PDA diluido y PDA deshidratado (Anexo I), preparadas con 4 días de anticipación. Las cajas se incubaron a 24 °C ± 1 en oscuridad. Después de 15 días se observó el tipo de colonia, color de micelio y pigmentación en medio de cultivo.

1.2.5 Caracterización morfológica

Se inocularon 15 µL de una suspensión de conidios almacenada a 4 °C en cajas 60 x 15 mm con medios CLA (Anexo I) y SNA (Leslie y Summerell, 2006) que se prepararon con 4 días de anticipación. Los cultivos se incubaron bajo luz blanca y negra a 24 °C ± 1. Después de 15 días se hicieron preparaciones para observar en el microscopio compuesto tomando muestras de medio con micelio y trozos de clavel. Se realizaron las siguientes observaciones:

- a) Macroconidios: En 25 conidios por aislado se determinó la forma, el número de septos, la longitud y el ancho.
- b) Microconidios: De 25 unidades de este tipo de estructuras por aislado se registró la forma, el tipo de fiálide, la longitud y el ancho.
- c) Se determinó la presencia de hifas enrolladas estériles y de clamidosporas.

1.2.6 Caracterización genética

1.2.6.1 Extracción de ADN

Los aislados de *Fusarium* fueron cultivados en tubos con medio mínimo (Anexo I) por 4 días en oscuridad a 24 °C. El micelio obtenido se colectó en un embudo de vidrio con tela Miracloth (Calbiotech, E.U.A), se lavó con 100 mL de agua destilada estéril y se colocó en una caja Petri 100 x 15 mm estéril. Ese micelio se cubrió con una toalla de papel estéril y se deshidrató colocando las cajas a 28 °C por 8 horas. El micelio deshidratado se molió con nitrógeno líquido y se almacenó en micro tubos a -20 °C. Una porción de éste se tomó con una espátula estéril y se colocó en un micro tubo. La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, E.U.A).

1.2.6.2 Amplificación de ADN

Para amplificar el gen factor de elongación de la traducción se utilizaron los oligonucleótidos descritos por O'Donnell *et al.* (1998). En la amplificación por PCR se empleó una temperatura de desnaturalización de 94 °C, una temperatura de hibridación de 55 °C y una temperatura de elongación de 72 °C, por 35 ciclos en un termociclador (Eppendorf, E.U.A). Los amplicones fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % TAE a 50 volts por 90 min. Los fragmentos amplificados se purificaron con un kit comercial Wizard SV gel and PCR Clean-Up System. (Promega). El ADN purificado fue enviado a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para la secuenciación de cada una de las cadenas complementarias para cada región del ADN amplificado. Las secuencias obtenidas se editaron usando el programa BioEdit versión 7.1.3 (Hall, 2011). Se creó una secuencia consenso y se alinearon a secuencias publicadas en el GenBank (NCBI). Para determinar aquellas secuencias con las que presentaran una máxima similitud del 100 % se utilizó el programa BLASTN 2.2. 19 (Zhang *et al.* 2000).

1.3 RESULTADOS

Se realizaron cuatro muestreos en cuatro sitios de la región centro-occidente del Pacífico mexicano, comprendiendo a la zona productora de mango de los estados de Colima y Jalisco (Fig. 1).

1.3.1 Colima. Colectas

En el estado de Colima se muestreó un sitio en el predio San Rafael, municipio de Tecomán, en mayo de 2011. Los árboles de mango variedad Tommy Atkins presentaron síntomas atípicos de malformación vegetativa. La cual se observó en las yemas en los entrenudos del tallo. También se encontró malformación en yemas axilares y terminales en ramas (Fig. 2). El predio presentó 100 % de incidencia de la enfermedad. En una primera colecta se obtuvieron 36 muestras de tejido de mango con malformación de 12 árboles. Las muestras se procesaron mediante técnicas tradicionales (siembra directa del tejido en medio de cultivo) (Anexo II). Se obtuvo solamente un aislado por muestra. Del total de 36 muestras se obtuvieron 26 aislados con crecimiento típico de *Fusarium*. Las diez muestras restantes se contaminaron con hongos saprófitos por lo que fueron descartadas. Los aislados se dividieron en dos grupos de acuerdo al tipo de estructuras reproductivas que produjeron en medio SNA. Un grupo de 25 aislados (Grupo 1) presentó conidios en cadena. Mientras que el otro grupo (Grupo 2) estuvo representado solamente por un aislado, el cual produjo conidios en falsas cabezas. Este aislado se obtuvo de un árbol del cual también fue recuperado otro aislado con conidios en cadena (Grupo 1). Ambos aislados se obtuvieron de muestreos diferentes del mismo árbol.

El hallazgo de dos aislados morfológicamente distintos en un árbol de mango, sugirió la posibilidad de que en un mismo tejido malformado pudieran coexistir dos o más taxones de *Fusarium*. Debido a que por los métodos tradicionales de aislamiento, solamente se recupera un aislado, fue necesario utilizar otra técnica para tratar de obtener más taxones por muestra de tejido malformado. Por lo tanto, se realizó una segunda colecta en la cual se seleccionaron cinco árboles para tomar dos muestras por árbol; una de tejido floral malformado y otra de tejido vegetativo malformado. Para conseguir los aislados se utilizó un método distinto que consiste en moler los explantos en agua destilada estéril dando origen a una suspensión y diluciones seriadas, para

posteriormente distribuir una alícuota de cada dilución en la superficie de medio de cultivo (Anexo III). Utilizando esta técnica de diluciones seriadas, se obtuvieron colonias separadas en las cajas Petri, de las cuales cinco de ellas se seleccionaron al azar y se transfirieron a cajas con SNA. Las muestras de cuatro árboles se procesaron de esta manera. Las colonias obtenidas presentaron conidios dispuestos en cadena. Únicamente del árbol número 5, de la muestra de tejido con malformación vegetativa, se transfirieron 21 colonias al azar, de las cuales ocho produjeron conidios en cadena y las 13 produjeron falsas cabezas.

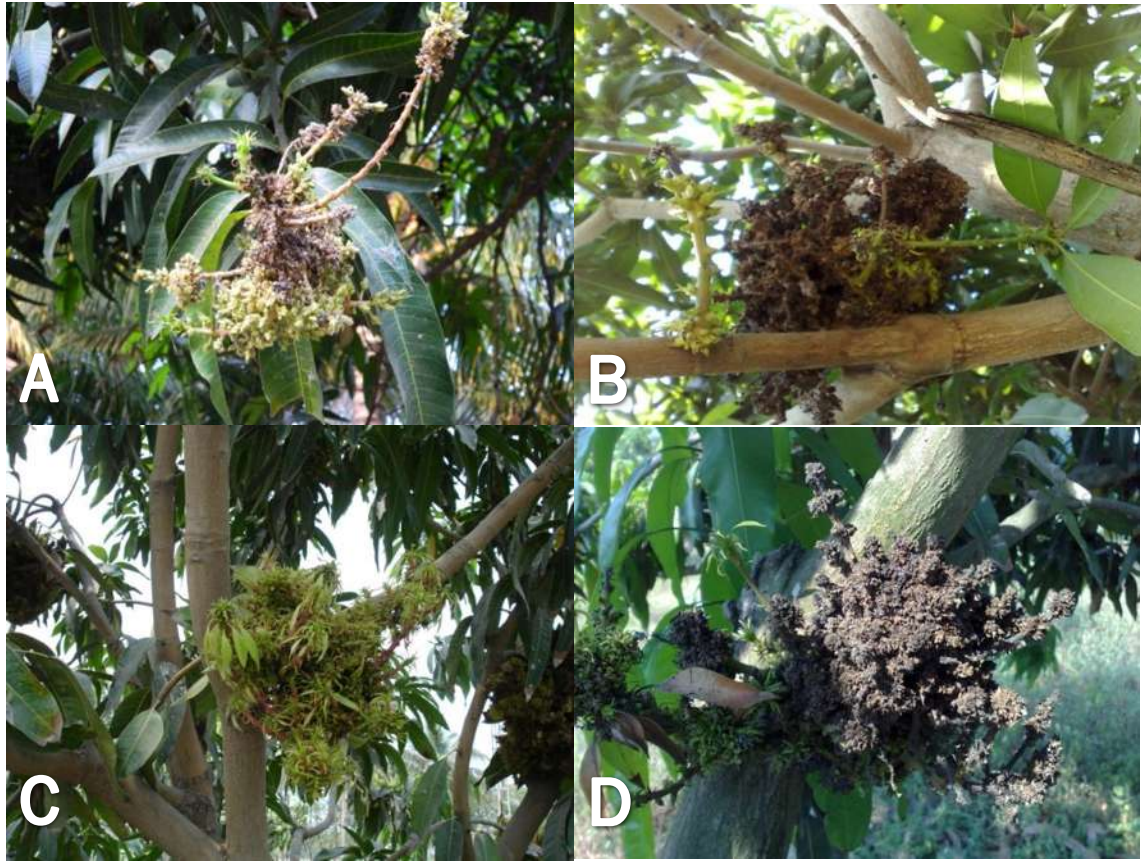


Figura 2. Síntomas de malformación en árboles de mango, variedad Tommy Atkins, en la localidad San Rafael, Tecomán, Colima. A. Síntomas típicos de la enfermedad en yemas apicales. B, C y D. Síntomas atípicos de la enfermedad en ramas.

1.3.2 Colima. Caracterización cultural

Las características observadas dividieron los aislados en dos grupos tal y como se mencionó en la sección anterior. El grupo 1 con 41 aislados mostraron diferencias en los dos medios utilizados; en PDA deshidratado las colonias presentaron micelio aéreo de color blanco a crema y amarillo pálido y con pigmentación roja en el medio de cultivo. Mientras que en PDA las colonias produjeron abundante micelio aéreo, denso de color blanco y con pigmentación también de color rojo en el medio de cultivo. El grupo 2 con 14 aislados tenían micelio aéreo poco denso de color blanco a amarillo ligero, y con pigmentación amarillo claro en el medio de cultivo.

1.3.3 Colima. Caracterización morfológica

El grupo 1 de aislados de *Fusarium* presentó los microconidios en monofiálides ramificadas y dispuestos en cadena, de forma oval con tamaño promedio de 11.13 x 4.82 μm e intervalos de 10 a 12.5 x 2.5 a 5 μm ; mientras que el macroconidio midió de 87.15 x 8.02 μm con intervalos de 80 a 100 x 2.5 a 5 μm . Estos aislados produjeron esporodoquios de color amarillo en CLA. En tanto aquellos del grupo 2 tuvieron los microconidios en falsas cabezas, en monofiálides simples, tamaño promedio de los macroconidios de 37.9 x 3.8 μm , con intervalos de 32.5 a 50 x 2.5 a 5 μm ; los microconidios fueron de forma oval, con tamaño promedio de 12.5 x 5 μm , y variaron entre 7.5 a 17.5 x 2.5 a 5 μm . No se observaron hifas enrolladas estériles ni clamidosporas en ambos grupos (Anexo IV).

1.3.4 Colima. Caracterización genética

El análisis BLAST (NCBI) confirmó la presencia de dos grupos entre los aislados de *Fusarium* obtenidos. El grupo 1 de aquellos que produjeron conidios en cadena mostraron similitudes del 97 y 98% con *Albonectria rigidiuscula*, sinónimo del anamorfo *F. decemcellulare* (Anexo VI). El grupo 2 de aislados que presentaron conidios en falsas cabezas tuvieron similitudes del 99 y 100% con secuencias de las cepas NRRL 53573 y NRRL 53570, las cuales son identificadas como *F. pseudocircinatum* (Anexo VI). Estas cepas fueron aisladas de tejido malformado de mango en Campeche y Guerrero (Otero-Colina *et al.* 2010).

1.3.5 Jalisco. Colectas

En Jalisco se muestrearon tres sitios en mayo de 2011. En el sitio 2, predio Agua Caliente, municipio de La Huerta, se colectaron diez muestras de tejido con malformación floral de árboles de mango variedad Kent. La incidencia de la enfermedad en este sitio fue del 10 %. En el sitio 3, predio El Palmar, municipio de La Huerta, se obtuvieron siete muestras de tejido con malformación floral en árboles de mango también de la variedad Kent. La incidencia fue del 15 %. En el sitio 4, predio Las Torres, ejido Villa Obregón, municipio de Cihuatlán, se colectaron 13 muestras de tejido con malformación vegetativa en mango de la variedad Keit. La incidencia de la enfermedad fue del 25 %.

Se obtuvieron 30 aislados por el método de siembra directa del tejido en medio de cultivo (Anexo II) de los 3 sitios muestreados en Jalisco. Todos los aislados presentaron conidios en falsas cabezas. Se consiguió un aislado por muestra.

1.3.6 Jalisco. Caracterización cultural

De acuerdo a las características del color, tipo de micelio y pigmentación en el medio de cultivo, los aislados originados de huertas comerciales del estado de Jalisco se dividieron en tres grupos. Cinco aislados (MXJAL-31, MXJAL-32, MXJAL-36, MXJAL-39 y MXJAL-46) presentaron abundante micelio aéreo color blanco con pigmentos amarillo ligero en el agar y con esporodoquios color amarillo. Los aislados del grupo II (MXJAL-20, MXJAL-21, MXJAL-22, MXJAL-23, MXJAL-24, MXJAL-25, MXJAL-26, MXJAL-27, MXJAL-28, MXJAL-29, MXJAL-30, MXJAL-34, MXJAL-35, MXJAL-37, MXJAL-38, MXJAL-40, MXJAL-42, MXJAL-43, MXJAL-44, MXJAL-47 y MXJAL-48) produjeron micelio color púrpura floculoso con pigmentación violeta claro en agar, no se observaron esporodoquios. EL grupo III representado por sólo un aislado (MXJAL-45) mostró micelio poco denso color blanco en el centro de la colonia y en la periferia de color rojo, no presentó pigmentación en agar y tampoco presentó esporodoquios

1.3.7 Jalisco. Caracterización morfológica

Los 30 aislados fungosos obtenidos produjeron macroconidios con un tamaño promedio de $43.89 \times 5.65 \mu\text{m}$, que variaron de 29.68×4.85 a $63.38 \times 7.05 \mu\text{m}$. Estos aislados tenían de 3 a 6 septos. Los más frecuentes fueron 3 septos.

En cuatro aislados no se observaron macroconidios en CLA. El microconidio fue de forma oval principalmente aunque se encontraron aislados en los que esta estructura tenía formas ovoide y arriñonada. Además tuvo un tamaño promedio de $9.82 \times 3.57 \mu\text{m}$, con intervalos de variación entre 4.2 a 12.9×2.5 a $5.4 \mu\text{m}$. Solamente un aislado no presentó microconidios. También se observaron microconidios sin septos pero la mayoría tuvieron un septo. Los conidios estaban dispuestos en falsas cabezas, en mono y polifiálides. Se observaron hifas enrolladas estériles en 9 aislados (Figura 3). No hubo producción de esporodoquios ni de clamidosporas (Anexo V.)

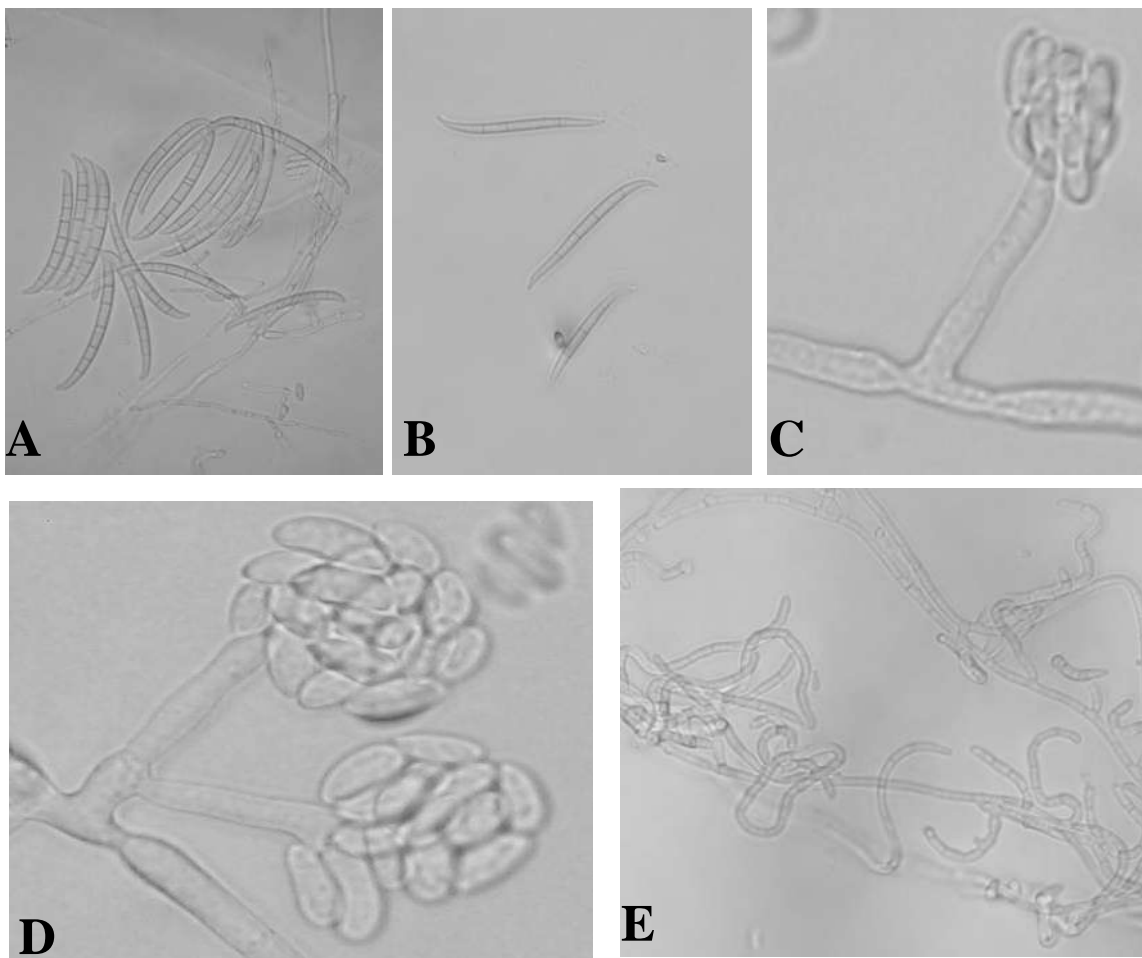


Figura 3. Características morfológicas en medio CLA de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de tejidos malformados de mango en Jalisco. A. MXCOL-226. Macroconidios. B. MXCOL-228. Macroconidios. C. Microconidios dispuestos en falsas cabezas en monofiálides MXJAL-30. D. Microconidios dispuestos en falsas cabezas en polifiálides MXJAL-35. E. Hifas enrolladas estériles MXJAL-23.

1.3.8 Jalisco. Caracterización genética

El análisis Blast indicó que las secuencias del gen factor de elongación de los aislados de Jalisco presentaron 100 % de máxima identidad con cepas de *F. mexicanum* (NRRL 53135, NRRL 53136), previamente estudiadas y obtenidas de árboles de mango con malformación en Michoacán (Otero-Colina *et al.* 2010). También tienen 100 % de identidad con cepas colectadas en Jalisco en años anteriores (MXJAL-3, MXJAL-8, MXJAL-13) (Betancourt-Resendes *et al.* 2013). Las secuencias de estos aislados presentan 99 % de máxima identidad con tres cepas de *F. subglutinans* (NRRL 26756, NRRL 26757 y NRRL 25346) colectadas en pasto y caña en África del Sur. Además las secuencias concuerdan en 99 % con una subpoblación de *F. mexicanum* detectada en Jalisco (MXJAL-1, MXJAL-2, MXJAL-17) (Betancourt-Resendes *et al.* 2013).

1.4 DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron aislados de *F. pseudocircinatum* asociados a tejidos malformados de mango en Colima. Esta especie ha sido reportada en varios sustratos en algunas regiones tropicales (Leslie y Summerell, 2006). Recientemente, Otero-Colina *et al.* (2010) la detectaron en huertos comerciales de este cultivo en Campeche y Guerrero. *F. pseudocircinatum* fue descrita por Nirenberg y O'Donnell (1998). La fase sexual se desconoce (Leslie y Summerell, 2006). Los aislados de este patógeno presentaron características morfológicas similares a las descritas para el complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*. Una de estas características que distingue a las especies de este complejo que causan malformación en mango es la presencia de hifas enrolladas estériles (Fig. 3E). Las siguientes especies presentan dicha característica: *F. mexicanum*, *F. proliferatum*, *F. sterilihyphosum* y *Fusarium* sp. # 4 (Britz *et al.* 2002; Leslie y Summerell, 2006; Quezada-Gutiérrez, 2011; Otero-Colina *et al.* 2010; Zhan *et al.* 2010). Sin embargo, *F. pseudocircinatum* no produce hifas enrolladas estériles, las cuales no fueron detectadas en los aislados de esta especie en este estudio.

F. pseudocircinatum ha sido reportado como un hongo que produce varias toxinas, tales como moniliformina, fumonisinas B1 y B2 (Fotso *et al.* 2002). Cepas de otras especies de *Fusarium*, tales como *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, pueden producir una gama amplia de micotoxinas (Leslie y Summerell, 2006). Se desconoce si este hongo genera alguna micotoxina en tejidos infectados de mango. Si las cepas de *F. pseudocircinatum* que infectan al mango son capaces de producirlas, esto podrían representar un problema de salud animal, ya que en ocasiones el ganado vacuno podría ingerir hojas y frutos de mango infectado con *F. pseudocircinatum*.

El otro grupo de aislados colectados en Tecomán, Colima, tuvo características similares a las reportadas para *F. decemcellulare* (Leslie y Summerell, 2006; Gonzaga-Espíritu, 2012). Este patógeno es un hongo que se encuentra usualmente en regiones tropicales y subtropicales asociado a canchales y muerte regresiva en ramas en varios árboles frutales, incluyendo mango (Leslie y Summerell, 2006; Ploetz y Freeman, 2009). Las características morfológicas y culturales de *F. decemcellulare* hacen que se puedan distinguir fácilmente de otras especies de *Fusarium*. Los macroconidios son largos con 5 a 9 septos, y raramente se confunde con otras especies del género (Leslie y Summerell, 2006).

Los aislados obtenidos en Jalisco presentaron características culturales y morfológicas que concuerdan con aislados de *F. mexicanum* previamente descritos para este estado (Betancourt-Resendes *et al.* 2013). La variación detectada en el tamaño del macroconidio en las especies de *Fusarium* depende si se forma en conidióforos aéreos o en esporodoquios (Otero-Colina *et al.* 2010). Las especies de *Fusarium* que causan malformación de mango a nivel mundial, presentan intervalos de variación muy similares en el largo de macroconidio, para *F. mangiferae* se ha reportado de 43 a 61 μm , para *F. sterilihyphosum* de 28 a 47 μm (Marasas *et al.* 2006) y para *F. mexicanum* de 29 a 42 μm (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Otero-Colina *et al.* 2010).

El análisis genético utilizando PCR para amplificar secuencias del gen factor de elongación, y Blast para compararlas con secuencias obtenidas, mostró que todos los aislados obtenidos en Jalisco presentaron 100 % de identidad con *F. mexicanum*. En un estudio filogenético previo de un grupo de 15 aislados de *F. mexicanum* obtenidos de tejidos malformados de mango en una huerta de ese mismo estado del país, se detectaron dos grupos. Las secuencias del gen factor de elongación de estos dos grupos de aislados se diferenciaron por cambios en tres posiciones (Betancourt-Resendes *et al.* 2013). Uno de estos grupos está formado por tres cepas, MXJAL-3, MXJAL-8 y MXJAL-13, las cuales presentan secuencias del gen factor de elongación, idénticas a las secuencias de los aislados estudiados en este trabajo. También mostraron 100 % de identidad con cepas de *F. mexicanum* colectadas de árboles de mango con malformación en Michoacán (Otero-Colina *et al.* 2010).

La falta de un control fitosanitario para el flujo de plántula de mango puede favorecer la dispersión del patógeno en zonas distantes. *F. mexicanum* parece ser que se ha diseminado en las zonas productoras de mango del Pacífico mexicano ya que se le ha detectado en Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y también Morelos (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Quezada-Gutiérrez, 2011; Betancourt-Resendes *et al.* 2013). Parece ser que ciertas especies de *Fusarium* que causan malformación del mango, predominan en algunas zonas productoras en el ámbito mundial. En Brasil se ha identificado principalmente a *F. sterilihyphosum* y *F. tupiense* (Zheng y Ploetz, 2002; Lima *et al.* 2012) En Asia se ha encontrado principalmente a *F. mangiferae* (Marasas *et al.* 2006). En África del Sur a *F. sterilihyphosum* (Steemkamp *et al.* 2000; Britz *et al.* 2002) y en México a *F.*

mexicanum (Otero-Colina *et al.* 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.* 2013). Es necesario realizar muestreos en otras áreas productoras de mango en México para determinar si existen especies adicionales de *Fusarium* que causen la malformación.

1.5 CONCLUSIONES

- Se detectó a *F. pseudocircinatum* y *F. decemcellulare* coexistiendo en tejidos malformados de mango, en una huerta ubicada en Tecomán, Colima.
- Se confirmó la prevalencia de *F. mexicanum* en árboles de mango con malformación en Jalisco.

1.6 LITERATURA CITADA

- Betancourt-Resendes, I., Velázquez-Monreal, J. J., Montero-Castro, J. C., Fernández-Pavía, S. P., Lozoya-Saldaña, H. y Rodríguez-Alvarado, G. 2013. ***Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 31. En prensa.
- Britz, H., T. E. Steenkamp, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, B. F. Marasas y M. J. Wingfield. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation.** *Mycology* 94: 722-730.
- FAO, 2012. Food and Agriculture Organization Statistical Database Internet. <http://faostat.fao.org/default.aspx> (Accesada en diciembre de 2012).
- Fotso, J., Leslie, J. F., and Smith, J. S. 2002. **Production of beauveriacin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2 and B3 by ex-type strains of fifteen *Fusarium* species.** *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5195-5197.
- Freeman, S., M. Maimon, y P. Yaakov. 1999. **Use of transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease.** *Phytopathology* 89: 456-461.
- Gonzaga-Espiríu, J. F. 2012. **Identificación de especies de *Fusarium* asociadas al agallamiento del mango en Colima.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. 74 P.
- Hall, T. 2011. BioEdit v7.1.3. **Biological sequence alignment editor for Windows.** Mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html (consulta, diciembre 2012).
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, M. A., and Leslie, J. F. 2009. **A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil.** *Plant Pathology* 58: 33-42.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M., y Leslie, J. F. 2012. ***Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil.** *Mycologia* 104: 1408-1419.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M., y Leslie, J. F. 2012. ***Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi***

- complex that causes mango malformation in Brazil.** *Mycologia* 104: 1408-1419.
- Marasas, W. F. O., Ploetz, R. C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., and Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.** *Phytopathology* 96: 667-672.
- Nirenberg H. I. y O'Donnell, K. 1998. **New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex.** *Mycologia* 90: 434-458.
- Noriega, C. D. H. 1996. **“Escoba de bruja” del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado.** Tesis Doctoral. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 72 pp.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. **Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex.** *Mycologia* 90:465-493.
- Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T. A., O'Donnell K. and Freeman, S. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov.** *Phytopathology* 100: 1176-1184.
- Ploetz, R .C. 2001.**Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica*L.** In: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D. and Bryden, W.L. (eds). *Fusarium:Paul E. Nelson Memorial Symposium*. American Phytopathological Society (APS) Press, St Paul, Minnesota, pp.233–247.
- Ploetz, R. C. y Freeman, S. 2009. **Foliar, Floral and Soilborne Diseases.** In: Litz RE (ed.). *The Mango. Botany, Production and Uses*. Second Edition. CAB International.
- Prieto, M. J. J., Covarrubias, A. J. E., Romero, C. A. y Figueroa, V. M. O. 2005. **Paquetes tecnológicos para el cultivo del mango en el estado de Colima.**<http://www.campocolima.gob.mx/.../planrector/PlanRectorMango.pdf> [(Consultado en Octubre del 2009).
- Quezada-Gutiérrez, M. C. 2011. **Análisis de poblaciones de *Fusarium* asociadas con malformación de mango en Colima.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.

- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C, and Valenzuela-Vázquez, M. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico.** *Plant Pathology* 57:781.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Otero-Colina, G., Ploetz, R. C., Aoki, T., O'Donnell, K., Maymon, M. and Freeman, S. 2013. **Identification and characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation disease in México.** *Acta Horticulturae* 992: 337-384.
- SIAP (servicio de información agroalimentaria y pesquera) http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado en marzo 2011).
- Steenkamp, E. T., Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., y Wingfield, M. J. 2000. **Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation.** *Molecular Plant Pathology* 1:187–193.
- Summanwar, A. S., Raychoudhuri, S. P., y Pathak, S. C. 1966. **Association of the fungus *Fusarium* sp. Sheld. with the malformation in mango.** *Indian Phytopathology* 19:227-228.
- Varma, A., Lele, V. C., Raychaudhuri, S. P., Ram, A. and Sang, A. 1974. **Mango malformation mango: a fungal disease.** *Phytopathologische Zeitschrift* 79: 7-254.
- Zhan, R-L., Yang, S-J., Ho, H.-H., Liu, F., Zhao, Y.-L., Chang, J.-M., y He, Y.-B. 2010. **Mango malformation disease in South China caused by *Fusarium proliferatum*.** *Journal of Phytopathology* 158: 721-725.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., y Miller, W. 2000. **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *Journal of Computational Biology* 7: 203-14.
- Zheng, Q. y Ploetz, R. C. 2002. **Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay.** *Plant Pathology* 51: 208-216.

CAPITULO II

COINFECCIÓN DE *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* EN PLANTAS DE MANGO

RESUMEN

La enfermedad malformación del mango es causada por varias especies de *Fusarium*. En México se han detectado 3 taxones involucrados con este problema, mientras que en África del Sur son dos las especies detectadas, y en Brasil son tres. A la fecha, se desconocen las características genéticas que se asocian con especies de este hongo causantes de la malformación del mango, y las interacciones que éstas podrían presentar en campo. El objetivo de este trabajo fue determinar si ocurre coinfección en plantas de mango inoculadas con aislados de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum*. Estos dos taxones presentan 16 nucleótidos diferentes entre sí en las secuencias del gen factor de elongación de la traducción EF-1 α . Las cepas se inocularon individualmente y en combinación, en yemas en dormancia de plantas de mango variedad Kent de un año de edad. El análisis de los tejidos inoculados se realizó cinco meses post-inoculación. A partir de tejidos asintomáticos de yemas brotadas se obtuvieron aislados, los cuales fueron caracterizados amplificando la región EF-1 α . Las secuencias de los aislados de las plantas coinoculadas y las secuencias de los aislados de las plantas control fueron comparadas. El análisis Blast mostró que los aislados recuperados del tratamiento T2, inoculadas con *Fusarium* sp. MXCOL-113, presentaron un 99 % de identidad con cepas de *Fusarium* sp. Las secuencias de los aislados obtenidos de las plantas del tratamiento T3, inoculadas con *F. mexicanum*, tuvieron un 99 % de identidad con cepas de *F. pseudocircinatum*. Los aislados del tratamiento T4, de coinoculación de cepas, tuvieron secuencias idénticas también a *F. pseudocircinatum*. Estos resultados sugieren que el uso de plantas de viveros para estudios de fitopatología no es confiable debido a que *Fusarium* puede estar infectando plantas de mango en esa etapa de manera asintomática.

ABSTRACT

Mango malformation is caused by several species of *Fusarium*. In Mexico three taxon have been detected involved with this problem, while in South Africa and Brazil two and three *Fusarium* species were detected. Until now, the genetic characteristics associated with *Fusarium* species causing mango malformation are unknown, as well as the interactions that these species could have in the field. The objective of this work was to determine if co-infection can occur in mango plants inoculated with *Fusarium* sp. MXCOL-113 and *F. mexicanum* strains. The strains were inoculated individually and mixed, in dormant buds from mango plants var. Kent at one year of age. Analysis of the inoculated tissue was carried out five months after inoculation. *Fusarium* isolates were obtained from asymptomatic tissues and they were characterized by amplification of a region of the elongation factor EF-1 α . Sixteen nucleotide positions are different between *F. mexicanum* and *Fusarium* sp. MCOL-113. The sequences of *Fusarium* isolates from the inoculated plants and the sequences of those isolates from the control plants were compared. Blast analysis showed that the recovered isolates from the T2 treatment, inoculated with *Fusarium* sp. MXCOL-113, presented 99 % of identity with strains of *Fusarium* sp. The sequences of the isolates obtained from the plants of the T3 treatment, inoculated with *F. mexicanum*, showed 99 % of identity with strains of *F. pseudocircinatum*. The isolates from T4 treatment, inoculated at the same time, presented identical sequences to *F. pseudocircinatum*. These results suggest that the use of nursery mango plants for phytopathological studies is not reliable because *Fusarium* can be infecting them asymptotically.

2.1 INTRODUCCIÓN

La malformación es una de las enfermedades más importantes que ataca al cultivo del mango (*Mangifera indica* L.) a nivel mundial. Este problema afecta los tejidos vegetativos impidiendo el desarrollo normal de follaje y los tejidos reproductivos favoreciendo la formación de flores hermafroditas e incrementando el número de flores masculinas, impidiendo la producción de fruto (Ploetz, 2001).

La malformación de mango es causada por varias especies del género *Fusarium* (Marasas *et al.* 2006). Investigaciones recientes han reportado taxones adicionales de *Fusarium* patogénicos en mango en el hemisferio occidental. Se ha señalado un nuevo linaje del tipo *F. subglutinans* asociado a esta enfermedad en Brasil, al cual se le ha denominado *F. tuiense* (Lima *et al.* 2009a, 2012). El análisis genético en base a AFLPs y grupos de compatibilidad vegetativa mostraron variación genética significativa presente en la población; sin embargo, éstos parecen ser genotipos clonales que se reproducen principalmente de manera asexual (Lima *et al.* 2009b). En Colima, Guerrero, Michoacán y Morelos, México, se detectó un taxón morfológicamente similar a *F. sterilihyphosum* pero genéticamente distinto (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008), denominado formalmente como *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010; Rodríguez-Alvarado *et al.* 2013). En Colima se obtuvo un aislamiento morfológicamente similar a *F. mexicanum*, pero el análisis filogenético mostró que era un taxón diferente. Al cual se le llamó provisionalmente *Fusarium* sp. # 4 (Otero-Colina *et al.* 2010). Posteriormente, aislados adicionales se han obtenido de tejidos malformados de mango también en Colima, y que son similares a *Fusarium* sp. # 4. Uno de estos aislados es *Fusarium* sp. MXCOL-113, para el cual se confirmó su patogenicidad en la misma especie frutal (Quezada-Gutiérrez, 2011). Hasta este momento no se cuenta con una clara identidad de estos aislados, ya que presenta diferencias importantes en la secuencia parcial del gen factor de elongación con respecto a *F. mexicanum*. Además estos aislados de *Fusarium* podrían ser un nuevo taxón causante de la enfermedad (Quezada-Gutiérrez, 2011).

El análisis cultural y genético de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* permite distinguirlos. Quezada-Gutiérrez (2011) comparó el crecimiento cultural en medio PDA y encontró que las cepas de *Fusarium* sp. MXCOL-113 presentan micelio ligeramente denso de color rojo claro en PDA deshidratado y violeta pálido en PDA fresco. Las cepas de *F. mexicanum* presentaron micelio no denso, de

color salmón intenso en PDA deshidratado y salmón claro en PDA fresco. En el análisis de las secuencias parciales del gen factor de elongación, se detectó una diferencia en 16 posiciones entre ambos taxones, por lo que se pueden distinguir amplificando la secuencia de dicho gen.

A la fecha, se desconocen las interacciones que estas especies de *Fusarium* podrían tener en campo. La ocurrencia de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* en el estado de Colima, presenta una oportunidad para estudiar la interacción entre ambas especies en mango. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si ocurre coinfección en plantas de mango inoculadas con una mezcla de aislados de *Fusarium* sp.MXCOL-113 y *F. mexicanum*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Cepas utilizadas en los experimentos

***F. mexicanum* MXCOL-101.** Esta cepa se obtuvo de tejido vegetativo malformado de mango colectado en una huerta comercial en el municipio de Villa de Álvarez, Colima, en el año 2007 (Quezada-Gutierrez, 2011). La cepa MXCOL-101 se identificó como *F. mexicanum*. Las pruebas de patogenicidad con ella fueron exitosas en plantas de mango criollo (Quezada-Gutierrez, 2008 y 2011). Y está almacenada como suspensión de conidios en glicerol al 15% -70 °C, en la Colección de Hongos en el Laboratorio de Patología Vegetal, UMSNH.

***Fusarium* sp. MXCOL-113.** Esta cepa de *Fusarium* se aisló de tejido floral malformado de mango procedente de una huerta comercial en el municipio de Manzanillo, Colima, en el año 2009 (Quezada-Gutiérrez, 2011). La cepa MXCOL-113 se nombró provisionalmente como *Fusarium* sp. MXCOL-113.

2.2.2 Inóculo

Para la obtención del inóculo se sembraron 20 µL de una suspensión de conidios en glicerol al 15 % almacenada a -70 °C de cada cepa de *Fusarium*, en cajas de Petri 60 x 15 mm con SNA (Anexo I). Se utilizaron 5 cajas por cepa. Las cuales se incubaron por diez días bajo luz blanca y negra a 24°C ± 1 con un fotoperiodo de 12 horas.

2.2.3 Plantas de mango

Se adquirieron plantas de mango variedad Kent en un vivero comercial de árboles frutales llamado El Edén, localizado en Tecomán, Colima. Las plantas eran de un año de edad y tenían yemas en dormancia. Se mantuvieron, durante todo el experimento, en un vivero al aire libre en el Campo Experimental de Tecomán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Tecomán, Colima.

2.2.4 Inoculación

Las plantas de mango variedad Kent se inocularon haciendo una herida con una navaja estéril en la parte abaxial de la yema en el cambium vascular entre el tallo y el pedúnculo de la hoja. Como inóculo se utilizó un disco (1mm) de

medio con micelio del hongo y se colocó dentro de la herida. Cada planta inoculada se cubrió con una bolsa de plástico humedecida. La bolsa se retiró a las 24 horas post inoculación. Se utilizaron cuatro plantas por tratamiento y cuatro yemas en dormancia por planta.

2.2.5 Tratamientos

Un total de seis tratamientos fueron utilizados. Un testigo negativo (T1) en el cual, las plantas se inocularon con discos (1 mm) de medio de cultivo SNA. Un testigo positivo (T2), en el que las plantas fueron inoculadas con *Fusarium* sp. MCOL-113. Otro testigo positivo (T3) que incluyó plantas inoculadas con *F. mexicanum*. El tratamiento 4 (T4) fue para la coinoculación de ambas especies de *Fusarium* en la misma herida, la cual se realizó al mismo tiempo. El tratamiento 5 (T5) consistió en plantas de mango que se inocularon con *Fusarium* sp. MXCOL-113 y, en las cuales a los 15 días post inoculación se volvió a hacer una herida en el mismo punto de la inoculación previa y se les inoculó a *F. mexicanum*. En el tratamiento 6 (T6) las plantas se inocularon con *F. mexicanum* y también a los 15 días post inoculación se les inoculó a *Fusarium* sp. MXCOL-113 como se describió en el tratamiento T5.

2.2.6 Análisis de las plantas inoculadas

Las plantas fueron evaluadas a los cinco y siete meses después de la inoculación. Para el primer análisis a los cinco meses se tomaron muestras de la parte apical de las yemas inoculadas que habían brotado. Mientras que para el segundo análisis a los siete meses se utilizó como muestra la zona del tallo donde se habían realizado las inoculaciones. El tejido se cortó con tijeras para material vegetal y las muestras se depositaron en bolsas de polietileno. Las tijeras utilizadas se asperjaron con alcohol al 96° y se flamearon entre cada planta. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Patología Vegetal de la UMSNH y se colocaron a 4 °C hasta su procesamiento.

2.2.7 Aislados de *Fusarium*. Diluciones seriadas

La obtención de aislados de *Fusarium* mediante diluciones seriadas se realizó de acuerdo al Anexo III pero con modificaciones. De cada tratamiento se obtuvo una muestra compuesta de tejido de mango de los brotes emergidos en

las yemas inoculadas. Inicialmente, el tejido colectado en campo se lavó con agua corriente y jabón. Y se hicieron de cuatro a cinco cortes de tejido de aproximadamente 5 cm² para obtener explantos. Los cuales fueron colocados en una solución de jabón (marca comercial Roma) al 10 % durante 5 minutos, después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6 % (Clorox) por siete minutos; y después se secaron con toallas de papel estéril. Los explantos se cortaron en trozos más pequeños de aproximadamente 2 cm² y se depositaron en un mortero con 1 mL de agua destilada y se maceraron hasta obtener una suspensión (dilución 10⁰). De la cual se transfirieron 500 µl a un tubo de ensayo con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 10⁻¹), éste se agitó manualmente y de ahí se tomaron 500 µl que fueron transferidos a otro tubo con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 10⁻²). Los tubos fueron agitados manualmente y 25 µl de cada dilución (10⁰, 10⁻¹ y 10⁻²) se colocaron en cajas Petri 100 X 15 mm con medio PDA fresco diluido, suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. La suspensión se distribuyó en el medio con una varilla de vidrio. Las cajas fueron incubadas a 24 °C ± 1 en obscuridad. Las colonias que presentaron crecimiento típico de *Fusarium* fueron transferidas a cajas con medio SNA, y se incubaron a 24 °C ± 1 en luz blanca y negra, con un fotoperiodo de 12 horas. Posteriormente, los aislados ya crecidos en SNA se almacenaron como discos de este medio con micelio en microtubos con agua destilada estéril a 4 °C y en suspensión de conidios en glicerol al 20 % en tubos criogénicos a -70 °C.

2.2.8 Caracterización cultural

Para realizar la caracterización cultural de los aislados de *Fusarium* obtenidos, para cada caso se inocularon 15 µL de una suspensión de conidios almacenada a 4 °C, en cajas Petri 60 x 15 mm con medio PDA deshidratado (Anexo I) preparado con 4 días de anticipación. Las cajas se incubaron a 24 °C ± 1 en obscuridad y 15 días después se observó y registró el tipo de colonia, color de micelio y pigmentación en medio de cultivo.

2.2.9 Caracterización genética

2.2.9.1 Extracción de ácidos nucleicos

Los aislados de *Fusarium* obtenidos fueron cultivados en cajas Petri 60 x 15 mm con PDA por 10 días en obscuridad a 24 °C. De ahí se tomaron tres discos

(3 mm) de medio con micelio de los cultivos y se colocaron en tubos para microcentrífuga, a los cuales se les agregó nitrógeno líquido tres veces. La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, E.U.A).

2.2.9.2 Amplificación de ADN

Para amplificar el gen factor de elongación de la traducción se emplearon los oligonucleótidos descritos por O'Donnell *et al.* (1998). Para ello se utilizaron las temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación de 94, 55 Y 72 °C, respectivamente, por 35 ciclos en un termociclador (Eppendorf, E.U.A). Los amplicones obtenidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % TAE, a 50 volts por 90 minutos. Los fragmentos amplificados se purificaron con un kit comercial Wizard SV gel and PCR Clean-Up System. (Promega). El ADN purificado fue enviado a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para realizar su secuenciación.

2.2.9.3 Análisis BLAST

Las secuencias del ADN obtenidas se editaron usando el programa BioEdit versión 7.1.3 (Hall, 2011). Además se creó una secuencia consenso y se alinearon a secuencias publicadas en el GenBank (NCBI). El programa BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.* 2000) fue utilizado para determinar aquellas secuencias con las que presentaran una identidad del 100 %.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Colecta 1. En las plantas de mango las yemas brotaron a los 15 días después de la inoculación. Durante el tiempo que duró el experimento las plantas inoculadas no mostraron síntomas de malformación. Cinco meses después de la inoculación se realizó un primer muestreo de la parte apical de las yemas que brotaron para llevar a cabo aislamientos por diluciones seriadas. Las colonias desarrolladas en medio de cultivo se transfirieron a SNA por punta de hifa para caracterizarlas. Se obtuvieron aislados fungosos solamente de los tratamientos T2 (inoculación de *Fusarium* sp. MXCOL-113), T3 (inoculación de *F. mexicanum*) y T4 (inoculación de ambas cepas). Las plantas del tratamiento T1 (testigo) no produjeron aislados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados del experimento 1. Aislados de *Fusarium* obtenidos de tejido asintomático de plantas de mango inoculadas individualmente o en mezclas con *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum* MXCOL-101.

Tratamiento ^a	Muestreo 1 ^b		Muestreo 2 ^c	
	Plantas colonizadas	Aislados	Plantas colonizadas	Aislados
T1	ND ^d	ND	ND	ND
T2	10		1	1
T3	10		2	3
T4	3	20	2	10
T5	ND	ND	3	7
T6	ND	ND	ND	ND
TOTAL	9	40	8	24

^aT1. Medio sin micelio; T2. *Fusarium* sp. MXCOL-113; T3. *Fusarium mexicanum* MXCOL-101; T4. Coinfección. *Fusarium* sp. MXCOL-113 / *Fusarium mexicanum* MXCOL-101; T5. Coinfección. *Fusarium* sp. MXCOL-113 / 15 días después *Fusarium mexicanum* MXCOL-101; T6. Coinfección. *Fusarium mexicanum* MXCOL-101 / 15 días después *Fusarium* sp. MXCOL-113.

^b Aislamientos realizados a los cinco meses post inoculación de la parte apical de las yemas que brotaron.

^c Aislamientos realizados a los siete meses post inoculación de la parte del tejido donde se inoculó.

^d No se detectó colonización por *Fusarium*.

2.3.2 Colecta 2. De la parte del tallo de las plantas de mango donde se hizo la inoculación de *Fusarium* a los siete meses se tomaron muestras para hacer aislamientos en el laboratorio. Se obtuvieron aislados de los tratamientos T2 (inoculación de *Fusarium* sp. MXCOL-113), T3 (inoculación de *F. mexicanum*), T4 (inoculación de ambas cepas), y T5 (inoculación de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y posterior inoculación con *F. mexicanum*). No se originaron aislados de las plantas control T1 (Cuadro 1).

2.3.3 Caracterización genética de aislados obtenidos

2.3.3.1 Colecta 1. Una selección de los aislados de *Fusarium* resultantes se caracterizó genéticamente amplificando secuencias del gen factor de elongación. Entre los aislados que se incluyeron están cinco obtenidos de plantas de mango inoculadas con *F. mexicanum* (T3), otros cinco procedentes de plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MXCOL-113 (T2) y 20 originados de plantas inoculadas con una mezcla de ambos taxones (T4).

Las secuencias de los aislados procedentes de las plantas del tratamiento T2 presentaron 99 % de identidad con cepas de *Fusarium* sp. obtenidas de mango variedad Ataulfo con malformación, colectado en Campeche, México (Otero-Colina *et al.* 2010). Además, tuvieron el mismo porcentaje de similitud con cepas de *Fusarium* sp. generadas de *Chinchona* en la República Democrática del Congo, y con cepas de *Fusarium* sp. Originadas de un hospedante desconocido en Brasil (Otero-Colina *et al.* 2010). Las secuencias de los aislados resultantes de las plantas de los tratamientos T3 y T4 corresponden en un 99 a 100 % de identidad con cepas de *F. pseudocircinatum* obtenidas de árboles de mango con malformación en Guerrero y Campeche (Otero-Colina *et al.* 2010) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis BLAST de los aislados de *Fusarium* obtenidos de plantas asintomáticas de mango variedad Kent, inoculadas con cepas de *Fusarium* sp. MXCOL-113 y *F. mexicanum*.

Tratamientos	Accesión	Descripción	Identidad	Localidad
T2 5 aislados	GU737396.1	<i>Fusarium</i> sp. 2. NRRL 53293	99 %	Rep. Democrática del Congo
	GU737397.1	<i>Fusarium</i> sp. 2. NRRL 53294	99 %	Rep. Democrática del Congo
	GU737395.1	<i>Fusarium</i> sp. 2. NRRL 53574	99 %	Campeche, México
	AF160300.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25623	99 %	Brasil
	DQ452860.1	<i>Fusarium</i> sp. 1 NRRL 53996	99 %	Brasil
T3 5 aislados	GU737398.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 53570	99 %	Guerrero, México
	AF16071.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 22946	99 %	Desconocido
	GU737399.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 53573	99 %	Campeche, México
T4 20 aislados	GU737398.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 53570	100 %	Guerrero, México
	GU737399.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 53573	99 %	Campeche, México
	AF16071.1	<i>F. pseudocircinatum</i> NRRL 22946	99 %	Desconocido

^aT2. *Fusarium* sp. MXCOL-113; T3. *Fusarium mexicanum* MXCOL-101; T4. Coinfección. *Fusarium* sp. MXCOL-113 / *Fusarium mexicanum* MXCOL-101.

2.3.3.2 Colecta 2. Los aislados fungosos obtenidos en de la segunda colecta no se caracterizaron debido a los resultados que se tuvieron con los aislados de la colecta 1, en los que se detectó a *F. pseudocircinatum* y otros *Fusarium*.

2.4 DISCUSIÓN

Existen pocos estudios sobre coinfección en el mismo tejido de un hospedero, con dos o más cepas o especies de hongos patógenos de plantas. Adachi y Tsuge (1994) lograron detectarla con cepas de *Alternaria alternata* en lesiones foliares individuales del peral japonés, utilizando RFLP y análisis de ADN ribosomal (ADNr). McDonald y Martinez (1990) estudiaron la variabilidad genética en aislados de *Mycosphaerella graminicola* obtenidos de una misma lesión en hojas de trigo. Los resultados encontrados sugirieron la ocurrencia de coinfección en las lesiones de este cereal por diferentes aislados.

En *Fusarium* se ha investigado la interacción entre las especies que infectan maíz. Reid *et al.* (1999) la estudiaron este tipo de relación entre *F. graminearum* y *F. moniliforme*, analizando la severidad de la enfermedad, contenido de ADN y producción de micotoxinas. Ellos señalan que la competencia entre especies fúngicas depende de las condiciones ambientales, las condiciones de crecimiento y de la capacidad de cada cepa para infectar el tejido vegetal. También mencionan que *F. moniliforme* desplaza a *F. graminearum* debido a que presenta una tasa de crecimiento mayor. Se ha reportado que *F. moniliforme* es altamente exitoso al colonizar maíz y al desplazar especies de otros géneros fúngicos (Rheeder *et al.* 1990; Wicklow, 1988; Zummo *et al.* 1992).

En este estudio se detectaron dos taxones de *Fusarium* que no fueron inoculados inicialmente en las plantas de mango utilizadas en el experimento; los aislados diferentes a éstas resultaron ser *F. pseudocircinatum* y un *Fusarium* sp. similar a diversas cepas reportadas como *Fusarium* sp. # 2 (Otero-Colina *et al.* 2010). Una de estas cepas de *Fusarium* sp. # 2 fue obtenida de malformación floral en mango var. Ataulfo en Campeche (Otero-Colina *et al.* 2010). *F. pseudocircinatum* ha sido detectado en árboles de mango con malformación en Guerrero y Campeche (Otero-Colina *et al.* 2010). Los resultados sugieren que algunas de las plantas de mango variedad Kent utilizadas en los experimentos presentaban infección asintomática o latente con *F. pseudocircinatum* y un taxon desconocido de *Fusarium* (*Fusarium* sp. # 2). Estos *Fusarium* pudieron haber infectado a las plantas en el vivero comercial o durante el desarrollo del experimento. Los resultados también indican que especies de *Fusarium* pueden colonizar asintomáticamente o de manera latente los tejidos vegetales. En el trabajo de esta tesis (Capítulo I) se detectó a *F. pseudocircinatum* en una huerta

comercial de mango en Tecomán, Colima. Este hallazgo puede indicar que esta especie ya está presente en las plantas de mango en vivero sin mostrar los síntomas típicos de la enfermedad. Soto-Plancarte (2013) realizó un muestreo en plantas de mango con malformación en diversos viveros del estado de Michoacán para detectar las especies que causan malformación. Sus resultados, indican que *F. mexicanum* es el principal patógeno que causa la enfermedad en las plantas de vivero. Este patógeno también se ha encontrado en huertas comerciales en Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Otero-Colina *et al.* 2010). Por lo tanto, las malas prácticas de manejo del cultivo y la falta de inspección fitosanitaria están permitiendo la diseminación de las especies de *Fusarium* entre los árboles de las huertas de mango y las plantas de viveros.

El uso de plantas de mango obtenidas en viveros comerciales para estudios de patogenicidad podría ser una práctica no recomendable, debido a que pueden estar infectadas sin mostrar síntomas. Ploetz (2006) mencionó que *F. mangiferae* puede permanecer latente en los tejidos de mango sin mostrar los síntomas típicos de la enfermedad.

2.5 CONCLUSIONES

- El uso de plantas obtenidas de vivero no es recomendable para estudios fitopatológicos debido a que pueden estar infectadas sin mostrar los síntomas de alguna enfermedad.
- *F. pseudocircinatum* puede permanecer asintomático o en latencia en yemas en dormancia de plantas de mango.

2.6 LITERATURA CITADA

- Adachi, and Tsuge, T. 1994. **Coinfection by different isolates of *Alternaria alternata* in single black spot lesions of Japanese pear leaves.** *Phytopathology* 84: 447-451.
- Hall, T. 2011. BioEdit v7.1.3. **Biological sequence alignment editor for Windows.** Mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html (consulta, diciembre 2012).
- Lima C. S., Pfenning L. H., Costa M. A., and Leslie J. F. 2009a. **A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil.** *Plant Pathology* 17-26.
- Lima, C. S., Monteiro, J. H., Crespo, A. N., Costa, C. S. S., Leslie, J. F. and Pfenning, L. H. 2009b. **VCG y AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil.** *European Journal of Plant Pathology* 123: 17-26.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M., y Leslie, J. F. 2012. ***Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil.** *Mycologia* 104: 1408-1419.
- Marasas, W. F. O., Ploetz, R. C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., and Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.** *Phytopathology* 96: 667-672.
- McDonald, B. A. and Martinez, J. P. 1990. **DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field.** *Phytopathology* 80:1368-1373.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. **Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex.** *Mycologia* 90:465-493.
- Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T. A., O'Donnell K. and Freeman, S. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in México, *Fusarium mexicanum* sp. nov.** *Phytopathology* 100: 1176-1184.

- Ploetz, R. C. 2001. **Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera Indica* L.** In: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D. and Bryden, W.L. (eds). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. American Phytopathological Society (APS) Press, St Paul, Minnesota, pp.233–247.
- Ploetz, R. C. 2006. ***Fusarium*-Induced disease of tropical, perennial crops.** *Phytopathology* 96:648-652.
- Quezada-Gutiérrez, M. C. 2008. **Caracterización morfológica de aislados de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango con malformación en Colima.** Tesis de Licenciatura. Fac. Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.
- Quezada-Gutiérrez, M. C. 2011. **Análisis de poblaciones de *Fusarium* asociadas con malformación de mango en Colima.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.
- Reid, L. M., Nicol, R. W., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J. D., Young, J. C., Stewart, D. W and Schaafsma, A. W. 1999. **Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation.** *Phytopathology* 89: 1028-1037.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., and van Wyk, P. S. 1990. **Fungal association in corn kernels and effects on germination.** *Phytopathology* 80: 131-134.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C, and Valenzuela-Vázquez, M. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico.** *Plant Pathology* 57:781.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Otero-Colina, G., Ploetz, R. C., Aoki, T., O'Donnell, K., Maymon, M. and Freeman, S. 2013. **Identification and characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation disease in México.** *Acta Horticulturae* 992: 337-384.
- Soto-Plancarte, A. 2013. **Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango (*Mangifera indica* L.).** Tesis

de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 84 p.

Wicklow, D.T. 1988. **Patterns of fungal association within maize kernels harvested in North Carolina.** *Plant Disease*. 72: 113-115.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., y Miller, W. 2000. **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *Journal of Computational Biology* 7: 203-14.

Zummo, N., and Scott, G. E. 1992. **Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears.** *Plant Disease* 76: 771-773.

CAPÍTULO III

HETEROCARIOSIS *in planta* POR *Fusarium mexicanum*

RESUMEN

Fusarium mexicanum causante de la malformación del mango en la región centro occidente de México, ha mostrado poca diversidad genética y al parecer se reproduce clonalmente. El surgimiento de líneas clonales nuevas podría ocurrir por medio de heterocariosis entre individuos de poblaciones diferentes. El objetivo de este trabajo fue determinar si cepas de *F. mexicanum* tienen la capacidad de intercambiar información genética *in planta*. En los experimentos se utilizaron mutantes *nit1* y *nnu*, deficientes en enzimas de la ruta metabólica del nitrógeno, de dos cepas de *F. mexicanum* obtenidos en huertas de mango en Jalisco. Los mutantes utilizados pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (GCV). Éstos se inocularon de manera individual y en combinación en plantas de mango criollo de un año de edad. Cuatro meses después, algunas de las plantas mostraron síntomas de malformación vegetativa. Aislados fungosos obtenidos del tejido malformado fueron caracterizados fenotípicamente en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno. Dos plantas coinoculadas mostraron síntomas; de una de ellas se recuperó el mutante *nit1*; mientras que de la otra se obtuvo un aislado con micelio tipo silvestre o heterocarión. Cuando el experimento fue repetido, las plantas testigo inoculadas individualmente con las cepas mutantes presentaron síntomas de malformación un mes después. Las plantas control inoculadas con las cepas silvestres y las plantas coinoculadas con ambos mutantes también mostraron síntomas de malformación. Los aislados obtenidos de los tejidos con malformación mostraron en todos los casos crecimiento micelial típico del fenotipo silvestre, aun en las plantas inoculadas individualmente con los mutantes. Este resultado sugiere que pudo ocurrir contaminación de las plantas utilizadas en el experimento, con cepas de *F. mexicanum* de árboles de mango con malformación presentes en el área cercana a las plantas del experimento. Los resultados preliminares obtenidos en el experimento mostraron que los mutantes *nit1* y *nnu* tienen la capacidad de inducir los síntomas típicos de la enfermedad. Además, la inoculación de una mezcla de mutantes complementarios en plantas de mango y posterior recuperación de

cepas heterocariones sugiere la posibilidad de que ocurra intercambio genético *in planta* entre cepas compatibles vegetativamente.

ABSTRACT

Fusarium mexicanum is the causal agent of mango malformation in the central western region of Mexico. It has shown low genetic diversity and appears that it reproduces clonally. New clonal populations of this pathogen could appear by heterokariosis between individuals of different populations. The objective of this work was to determine if strains of *F. mexicanum* are capable of exchanging genetic information *in planta*. Experiments were carried out using *nit1* and *nnu* mutants, which are deficient in enzymes of the nitrate metabolic pathway, generated from two strains of *F. mexicanum* obtained from mango orchards in Jalisco. These mutants belong to the same vegetative compatibility group (VCG). The mutants were inoculated individually and mixed in mango plants cv. "criollo" that have one year of age. Four months after inoculation some of the plants showed vegetative malformation symptoms. Fungal isolates obtained from malformed tissues were characterized phenotypically using minimal medium supplemented with different nitrogen sources. Two plants inoculated with both mutants showed malformation symptoms; the mutant *nit1* was recovered from one plant and an isolate with wild type or heterokaryon mycelium was recovered from a second plant. When the experiment was repeated, the control plants inoculated individually with each mutant strain showed malformation symptoms one month after inoculation. Control plants inoculated with the wild type strain and the plants inoculated with both mutant strains also showed malformation symptoms. All the fungal isolates obtained from the malformed tissues showed a mycelial growth typical of the wild type, even from the plants inoculated individually with the mutant strains. This result suggests that probably occurred contamination of the plants used in the experiment, with strains of *F. mexicanum* from mango trees with malformation that were present in the nearby area of the experimental plants. The preliminary results obtained in the experiment showed that *nit1* and *nnu* mutants have the ability to induce typical symptoms of the disease. Moreover the inoculation of a mixture of complementary *Fusarium* mutants in mango plants and further recovery of heterokaryon isolates suggest the possibility of genetic exchange is occurring *in planta* among strains that have vegetative compatibility.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios de compatibilidad vegetativa han permitido analizar la diversidad genética en poblaciones de especies de *Fusarium* patógenas en cultivos agrícolas de importancia económica. La compatibilidad consiste en que dos hifas, de diferentes aislamientos de la misma especie, se puedan anastomosar para formar heterocariones estables. Los cuales poseen dos núcleos genéticamente distintos en una hifa o micelio y puede ser una fuente para explicar dicha variación. Los aislamientos que tienen la habilidad para formar heterocariones se dice que pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (Puhalla, 1985; Leslie y Summerell, 2006).

En poblaciones de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango se ha encontrado poca variabilidad genética, lo cual sugiere que no ocurre reproducción sexual (Lima *et al.* 2009). En *F. mexicanum* asociado a esta enfermedad en México, se han detectado cinco grupos de compatibilidad vegetativa en la zona productora de este cultivo en la zona centro de la costa del Pacífico. En Michoacán se descubrieron dos Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCVs) (Betancourt-Resendes *et al.* 2010). En Jalisco se encontraron otros dos GCVs (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2013), uno de los cuales también se detectó en Michoacán. En Colima se obtuvieron dos GCVs diferentes a los aislados de muestras de Jalisco y Michoacán (González-Jiménez, 2012). Estos resultados muestran que la diversidad genética en *F. mexicanum* es relativamente baja, lo cual indica que las poblaciones son clonales y que se están reproduciendo asexualmente.

Algunos investigadores consideran que la importancia de los procesos de heterocariosis en la naturaleza es baja o escasa. Existen muchos casos de hongos en los que es relativamente fácil forzar la formación de heterocariones en el laboratorio, aunque en campo no ha sido detectada en estos organismos. Lo anterior es considerado como un sólido argumento en contra de la ocurrencia natural de heterocariones. El descubrimiento de que solamente aislamientos compatibles vegetativamente pueden anastomosarse, reduce aún más la probabilidad de encontrar heterocariones en la naturaleza (Caten y Jinks, 1966).

Por otra parte, la utilización de cepas mutantes complementarias de *F. mexicanum* en experimentos *in planta*, permitirá analizar aspectos como competencia, inhibición e intercambio genético entre hongos en un mismo nicho

ecológico. Así, la anastomosis de micelio compatible de diferentes cepas en la naturaleza podría explicar la aparición de variación genética. Basado en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar si cepas de *F. mexicanum* causantes de la malformación del mango, eran capaces de intercambiar información genética vía anastomosis *in planta*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Localidad

Las plantas de mango utilizadas en los experimentos se mantuvieron bajo condiciones de sombreado en la localidad de La Huacana, municipio La Huacana, ubicada a los 18° 57' 30''N y 101° 49' 00''W. La altitud es de 550 msnm. El clima es A (w) i g w. Tropical seco con lluvias en verano según la clasificación de Koopen. La temperatura media anual es de 24 a 28 °C. Una temperatura mínima de 22 °C se presenta en los meses de diciembre y enero. La temperatura más alta, 35 °C, se registra en el mes de mayo. La época de lluvias ocurre durante el verano con una precipitación de 918 mm, siendo septiembre el mes más lluvioso. En esta localidad existen huertas de mango con árboles que presentan síntomas de malformación floral y vegetativa.

3.2.2 Cepas de mutantes y silvestres de *F. mexicanum*

Las cepas MXJAL-3 y MXJAL-8 se obtuvieron previamente de árboles de mango con malformación en el municipio de La Huerta, Jalisco, en 2007. Estas cepas se identificaron como *F. mexicanum* por sus características morfológicas, culturales y genéticas (Betancourt-Resendes *et al.* 2013). Y se encuentran como suspensión de conidios en glicerol al 25 % a -70 °C, en la colección micológica del Laboratorio de Patología Vegetal, UMSNH. La patogenicidad de estos aislamientos fue confirmada en plantas de mango criollo en el estudio de Betancourt-Resendes *et al.* (2013).

Las cepas mutantes *nit* de *F. mexicanum* MXJAL-3.9, MXJAL-3.14, MXJAL-8.10 y MXJAL-8.17, se generaron inoculando discos de 1 mm de medio con micelio de las cepas silvestres en medio mínimo (MM) con clorato al 2 %. Los mutantes aparecieron como sectores de crecimiento micelial en este medio. Se caracterizaron fenotípicamente en diversas fuentes de nitrógeno. Las cepas MXJAL-3.9 y MXJAL-8.10 presentaron fenotipo *nnu* que se caracteriza por una mutación en la vía global de nitrógeno (Marzluf, 1997; Leslie y Summerell, 2006). Estos mutantes tienen la capacidad de anastomosarse con mutantes *nit1* y revertir al fenotipo silvestre (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2013). Las cepas MXJAL-3.14 y MXJAL-8.17 mostraron fenotipo *nit1*. Estos mutantes poseen una mutación en el gen estructural *nit1* que codifica el polipéptido de la enzima nitrato reductasa (Leslie y Summerell, 2006). Estas cepas pertenecen al mismo grupo de

compatibilidad vegetativa (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2013). Las cepas se encuentran como suspensión de conidios en glicerol al 25 % a -70 °C, en la colección micológica del Laboratorio de Patología Vegetal, UMSNH.

3.2.3 Obtención de inóculo

A partir de suspensiones de conidios de las cepas mantenidas a -70 °C, se tomaron 15 µL y se sembraron en 2 cajas Petri 60 x 15 mm con MM (Anexo I). Los cultivos se incubaron a 24 °C ± 1, por 10 días, bajo luz blanca y negra para inducir abundante esporulación. Para obtener una suspensión de conidios se agregaron 2 mL de agua destilada estéril en una de las cajas Petri para lavar la mata micelial y desprender los conidios. La suspensión obtenida se pasó a la segunda caja para lograr una concentración adecuada de aproximadamente 7 x 10⁶ conidios por mL. La suspensión de conidios se almacenó en un microtubo estéril que se colocó en hielo por no más de una hora hasta su uso en las inoculaciones.

3.2.4 Plantas de mango

Se utilizaron plantas de mango criollo de un año de edad, las cuales se adquirieron en un vivero comercial, localizado en el Km 15 de la carretera Lombardía-Nuevo Urecho, en la localidad de Santa Casilda, municipio de Gabriel Zamora. Las plantas se seleccionaron buscando que tuvieran yemas apicales en dormancia.

3.2.5 Experimento: Inoculación de mutantes *nit* de *F. mexicanum* en plantas de mango

Un volumen de 20 µL de suspensión de conidios se depositó en las yemas apicales. Y se hicieron de 5 a 10 punciones con una aguja fina estéril a través de la gota depositada en cada yema. El área inoculada se cubrió con Parafilm durante 24 horas. Adicionalmente, las plantas inoculadas fueron cubiertas con una bolsa de plástico humedecida en su interior para proporcionar alta humedad a la planta por 24 horas. Se utilizaron cuatro plantas por tratamiento y cuatro yemas en dormancia por planta, con un total de nueve tratamientos (Cuadro 3). Las inoculaciones se realizaron en el mes de abril de 2011. La obtención de los aislamientos se realizó a los cuatro meses después de la inoculación. El

experimento se repitió en el mes de agosto de 2012 y finalizó en diciembre de 2012 (Repetición 2).

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento

Tratamientos		
Número	Cepas	Descripción
T1	Agua estéril	Testigo negativo: agua destilada estéril
T2	MXJAL-3	Testigo positivo: fenotipo silvestre
T3	MXJAL-8	Testigo positivo: fenotipo silvestre
T4	MXJAL-3.9	Testigo positivo: fenotipo mutante <i>nnu</i>
T5	MXJAL-3.14	Testigo positivo: fenotipo mutante <i>nit1</i>
T6	MXJAL-8.10	Testigo positivo: fenotipo mutante <i>nnu</i>
T7	MXJAL-8.17	Testigo positivo: fenotipo mutante <i>nit1</i>
T8	MXJAL-8.10/MXJAL-3.14	Fenotipo mutante <i>nnu</i> / fenotipo mutante <i>nit1</i>
T9	MXJAL-3.9/ MXJAL-8.17	Fenotipo mutante <i>nnu</i> / fenotipo mutante <i>nit1</i>

3.2.6 Recuperación de las cepas inoculadas de las plantas de mango con síntomas de malformación

Para recuperar las cepas de *Fusarium* inoculadas se obtuvo una muestra por planta de un brote con malformación vegetativa de 3 cm de largo. Los aislamientos se llevaron a cabo de acuerdo al método descrito en el Anexo III. Las muestras se sembraron en cajas Petri 100 x 15 mm con MM suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. Las colonias fungosas resultantes fueron transferidas por punta de hifa a cajas con MM y se incubaron a 24 °C ± 1 en oscuridad.

3.2.7 Caracterización fenotípica de las cepas obtenidas

Los aislados de *Fusarium* obtenidos de los tejidos malformados se caracterizaron fenotípicamente en medio basal (Anexo I) suplementado con diversas fuentes de nitrógeno: nitrato de sodio, hipoxantina o tartrato de amonio (Ver Anexo I). Discos (1mm²) de medio y micelio de cada aislado se transfirieron a cajas Petri 60 x 15 mm con las diferentes fuentes de nitrógeno. Los cultivos se

incubaron a 25 °C en obscuridad durante 7 días. Se observó el tipo de colonia formada para clasificar fenotípicamente a los mutantes tal como se describe en el Cuadro 4. El medio con tartrato de amonio sirvió como control positivo ya que en este medio todos los mutantes crecen como el tipo silvestre. El medio con NaNO₃ es el control negativo ya que todos los mutantes crecen de manera no densa (Leslie y Summerell, 2006).

Cuadro 4. Descripción de la caracterización fenotípica de mutantes *nit* de *Fusarium* en MM con diversas fuentes de nitrógeno.

Fenotipo	Fuentes de nitrógeno			
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Hipoxantina
Silvestre	Denso	Denso	Denso	Denso
^a Tipo de crecimiento micelial de la colonia	Denso	No denso	Denso	Denso
NitM	Denso	No denso	Denso	No denso
<i>nnu</i>	Denso	No denso	No denso	No denso
Micelio heterocarión	Denso	Denso	Denso	Denso

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Experimento. Repetición 1.

3.3.1.1 Sintomatología de las plantas inoculadas

Las plantas de los siguientes tratamientos mostraron los síntomas típicos de la enfermedad en brotes vegetativos a los cuatro meses después de la inoculación: los tratamientos T4 (MXJAL-3.9) y (T5 MXJAL-3.14), los cuales correspondieron a los testigos inoculados con cepas mutantes *nnu* y *nit1*, respectivamente, tuvieron una planta que presentó los síntomas de malformación; en el tratamiento T8, que consistió en la coinoculación de la cepa mutante *nnu* MXJAL-8.10 y la cepa mutante *nit1* MXJAL-3.14, hubo dos plantas que mostraron síntomas de la enfermedad; el tratamiento T9, a base de la coinoculación de la cepa mutante *nnu* MXJAL-3.9 y la cepa mutante *nit1* MXJAL-8.17, registró una planta con malformación. El testigo negativo presentó brotes sanos (Fig. 4).



Figura 4. Plantas de mango inoculadas con cepas silvestres y mutantes *nit* de *F. mexicanum*. A. Testigo negativo (agua). B). Planta inoculada con la cepa mutante *nnu* MXJAL-3.9. C). Planta inoculada con la cepa mutante *nit1* MXJAL-3.14. D y E). Planta coinoculada con las cepas mutantes *nnu* MXJAL-8.10 y *nit1* MXJAL-3.14. F). Planta coinoculada con las cepas mutantes *nnu* MXJAL-3.9 y *nit1* MXJAL-8.17. Las plantas mostraron síntomas de malformación 4 meses post-inoculación.

3.3.1.2 Aislados recuperados de los tejidos malformados

Los aislados de *Fusarium* que se obtuvieron de las plantas que mostraron síntomas de malformación vegetativa, fueron caracterizados fenotípicamente en cuanto a su tipo de crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno (Cuadro 5). Los aislados de las plantas de los tratamientos T4, T5 y T8, produjeron colonias con micelio no denso y no aéreo en medio suplementado con NO_3^- como fuente de nitrógeno. Mientras que los aislados de las plantas del tratamiento T9 produjeron colonias con crecimiento micelial de tipo silvestre o de un posible micelio heterocarión en dicho medio. Los nueve aislados del tratamiento T4 fueron caracterizados como fenotipo *nnu*, el cual fue el inoculado inicialmente. Los diez aislados obtenidos del tratamiento T5 presentaron características típicas del fenotipo *nit1*, que fue el inoculado. Los aislados recuperados de las plantas del tratamiento T8 presentaron el fenotipo *nit1*, similar al mutante inoculado en ellas. Los aislados a partir de las plantas del tratamiento T9 mostraron fenotipo silvestre.

No se recuperaron aislados con fenotipos de mutantes de las plantas de este tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de la coinoculación de cepas mutantes de *F. mexicanum* en plantas de mango y caracterización fenotípica de los aislados obtenidos de plantas con síntomas de malformación.

Tratamiento ^a	Plantas/Brotes malformación ^b	Tipo de crecimiento micelial				Fenotipo Recuperado
		Fuentes de nitrógeno				
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Hipoxantina	
T1	0					
T2	0					
T3	0					
T4	1/2	Denso	No denso	No denso	No denso	<i>nnu</i>
T5	1/2	Denso	No denso	Denso	Denso	<i>nit1</i>
T6	0					
T7	0					
T8	2/6	Denso	No denso	Denso	Denso	<i>nit1</i>
T9	1/6	Denso	Denso	Denso	Denso	Silvestre

^a Ver descripción de tratamientos en el Cuadro 3

^b Plantas con síntomas/total de brotes analizados

3.3.2 Experimento. Repetición 2

Las plantas de mango con los síntomas típicos de la enfermedad se observaron a las cuatro semanas post inoculación. Dos plantas del tratamiento T3, inoculadas con la cepa silvestre MXJAL 3 presentaron síntomas de malformación. En los tratamientos T4 y T5, inoculados con las cepas mutantes *nnu* y *nit1*, respectivamente, apareció una planta con síntomas. El tratamiento T9, coinoculado con cepas de ambos fenotipos (*nnu* y *nit1*), solamente mostró una planta con síntomas de la enfermedad.

A los cuatro meses post inoculación se realizaron aislamientos del tejido de mango malformado. Todas las colonias fungosas resultantes crecieron en medio con NaNO₃ presentando crecimiento micelial aéreo y denso, característico del

fenotipo silvestre. Aun en los aislamientos obtenidos de las plantas inoculadas con las cepas mutantes (testigos positivos), se observó crecimiento micelial aéreo y denso (Fig. 5B).

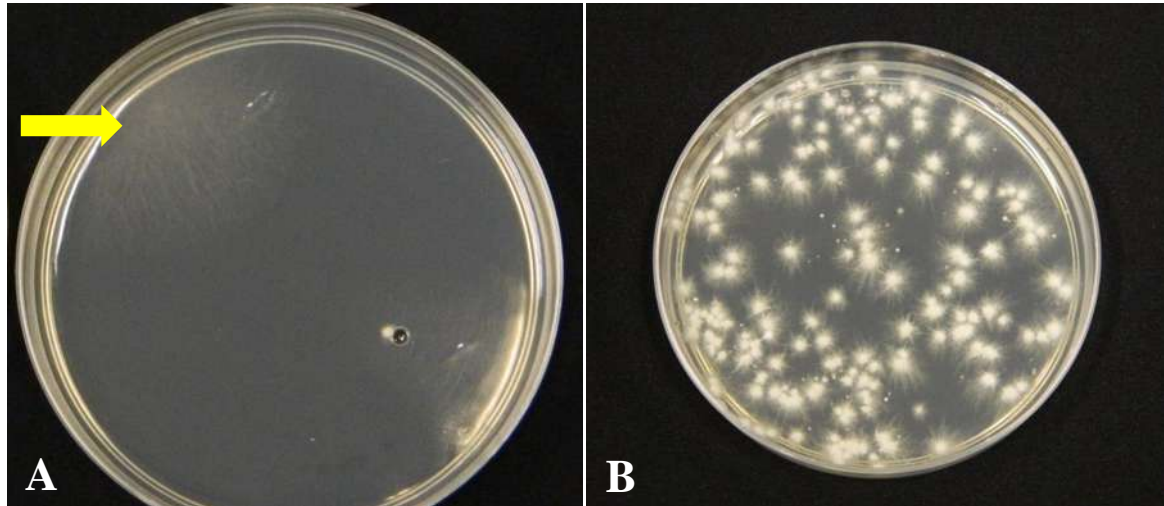


Figura 5. Comparación del tipo de crecimiento del micelio entre mutante *nit1* MXJAL-3.14 y la cepa silvestre MXJAL-3 de *F. mexicanum*, en medio con NaNO_3 . A. Micelio no denso (flecha) de mutante *nit* MXJAL-3.14. B. Colonias con crecimiento denso, obtenidas de tejidos malformados de plantas inoculadas con el mutante *nit1* MXJAL-3.14, en la Repetición 2 del experimento.

3.4 DISCUSIÓN

La generación de mutantes *nit* en hongos ascomicetos, ha sido una herramienta útil en estudios de diversidad en poblaciones. La inhabilidad de estos mutantes para utilizar NO_3^- como fuente de nitrógeno es ocasionada por una o más mutaciones en la ruta metabólica del nitrato. Esta característica se ha utilizado en pruebas de complementación entre mutantes con diferentes fenotipos, para determinar si existe compatibilidad vegetativa [grupos de compatibilidad vegetativa (GCV)] entre diferentes cepas de una misma especie de hongo (Puhala, 1985; Correll *et al.* 1986; Klitich y Leslie, 1988; Leslie y Summerell, 2006). Además, es relativamente fácil detectar mutantes debido al tipo de crecimiento no denso ni aéreo del micelio en un medio mínimo.

En la literatura científica no existen reportes de estudios de heterocariosis realizados *in planta* utilizando mutantes *nit*. Sin embargo, mutantes *nit* de *F. oxysporum* han sido utilizados para estudiar el comportamiento de cepas patogénicas en suelo. Se reportó que estos mutantes conservaron su patogenicidad después de haber sido recuperados de suelos inoculados con dichos mutantes (Hadar y Katan, 1989). En este trabajo, se reporta que mutantes *nit1* y *nnu* de *F. mexicanum* inoculados en plantas de mango fueron capaces de causar los síntomas típicos de la enfermedad malformación del mango. Lo anterior indica que las mutaciones presentes en éstos no están ligadas a genes que controlan la inducción de la malformación en mango.

Los aislados obtenidos de las plantas del tratamiento T8, coinoculadas con los mutantes *nit1* (MXJAL-3.14) y *nnu* (MXJAL-8.10), presentaron el fenotipo *nit1* idéntico al del mutante MXJAL-3.14, pero no al del mutante *nnu* MXJAL-8.10. Este resultado podría indicar una posible competencia entre las cepas para colonizar el tejido de mango. Existen reportes de competencia entre especies de *Fusarium* patógenas en maíz. Cuando *F. moniliforme* coloniza el tejido de maíz impide que otras especies de hongos colonicen la misma zona infectada (Kedara *et al.* 1994).

En los aislados procedentes de las plantas del tratamiento T9, coinoculadas con los mutantes *nit1* (MXJAL-8.10) y *nnu* (MXJAL-3.14), se observó un crecimiento de micelio idéntico al del tipo silvestre. En estos aislados no se recuperaron mutantes. Tales resultados sugieren que los aislados obtenidos presentan un micelio heterocarión, producto de la anastomosis entre las cepas mutantes *nnu* y *nit1*. Durante la anastomosis de hifas de cepas mutantes *nit*

complementarias, ocurre heterocariosis en el nuevo micelio formado, el cual mostrará las características de la cepa silvestre original. Es decir, el micelio heterocarión tendrá un crecimiento aéreo y denso en medio mínimo suplementado con NO_3^- (Leslie y Summerell, 2006). Los aislamientos silvestres de donde se obtuvieron las cepas mutantes *nit1* y *nnu* pertenecen al mismo GCV. Además, son idénticas en las secuencias de un fragmento del gen factor de elongación (Betancourt-Resendes *et al.* 2013). Para estudiar el fenómeno de anastomosis como vía para un intercambio genético de *F. mexicanum in planta*, se tendría que utilizar un número mayor de marcadores genéticos o emplear transformantes β -gluconoridasa (GUS). Freeman *et al.* (1999) usaron este tipo de transformantes en *F. subglutinans* para estudiar la etiología de la malformación del mango.

En la Repetición 2 diversas plantas mostraron síntomas de malformación vegetativa a los dos meses después de la inoculación, incluyendo las plantas testigo infectadas con las cepas mutantes *nit*. De estas plantas testigo se obtuvieron aislados que presentaron crecimiento del micelio de tipo denso en MM. Debido a que tales plantas solamente se inocularon con las cepas mutantes, y los aislados mostraron un crecimiento aéreo y denso, típico de las cepas silvestres, se consideró que había ocurrido una falla en el desarrollo del experimento. Por lo tanto, los aislamientos se descartaron de análisis posteriores. Las posibles causas de que las plantas testigo estuvieran infectadas con cepas silvestres son: A) Las plantas fueron infectadas en el vivero donde se adquirieron. Existen reportes de *F. mangiferae* causando malformación del mango en huertos comerciales en diversas áreas productoras en Asia y África que puede vivir latente en los tejidos asintomáticos (Ploetz, 2006). B) En el vivero donde se establecieron las plantas, la enfermedad podría haberse diseminado por ácaros, ya que éstos juegan un papel importante en ello. Se ha demostrado que *Aceria mangiferae* puede transportar los conidios de *F. mangiferae* en su cuerpo, el ácaro al alimentarse de las yemas de mango hace aberturas en el tejido facilitando la entrada directa de los conidios de *F. mangiferae* en las yemas a través de las heridas (Gamliel-Atinsky *et al.* 2009).

Para este tipo de estudios sería conveniente utilizar plántulas de mango obtenidas bajo condiciones de asepsia o *in vitro*. López-Estrada *et al.* (2008) proponen un método para obtener planta de mango libre de patógenos para estudios de patología.

3.5 CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican que los mutantes *nit1* y *nnu* de *F. mexicanum* tienen la capacidad para infectar mango y causar los síntomas típicos de la malformación.
- Existe un posible intercambio genético *in planta* entre cepas compatibles vegetativamente de *F. mexicanum* en mango.

3.6 LITERATURA CITADA

- Betancourt-Resendes, I., Gonzaga-Espíritu, J. F., Fernández-Pavía, S. P. y Rodríguez-Alvarado, G. 2010. **Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L) con malformación en Michoacán.** *Biológicas* 12(2): 135-142.
- Betancourt-Resendes, I., Velázquez-Monreal, J. J., Montero-Castro, J. C., Fernández-Pavía, S. P., Lozoya-Saldaña, H. y Rodríguez-Alvarado, G. 2013. ***Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 31. En prensa.
- Caten, C. E. y Jinks, J. L. 1966. **Heterokaryosis: Its significance in wild homotallic ascomycetes and fungi I perfecti.** *Transactions of the British Mycological Society* 49: 81-93.
- Correll, J. C., Puhalla, J. E y Schenider, R. W. 1986. **Vegatative compatibility groups among nopathogenic root-colonizing strains of *Fusarium oxysporum*.** *Canadian Journal of Botany* 64: 2358-2361.
- Freeman, S., Maimon, M., y Yaakov, P. 1999. **Use of transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease.** *Phytopathology* 89: 456-461.
- Gamliel-Atinsky, E., Freeman, S., Szejnberg, A., Maymon, M., Ochoa, R., Belausov, E. y Palevsky, E. 2009. **Interaction of mite *Aceria mangiferae* whith *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease.** *Phytopathology* 99: 152-159.
- González-Jiménez, N. N. 2012. **Compatibilidad vegetativa en poblaciones de *Fusarium mexicanum* y *Fusarium* sp. # 4 causantes de la malformación del mango en Colima.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.
- Hadar, E. y Katan, T. 1989. **The use of nitrate-nonutilizing mutants and selective medium for studies of pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*.** *Plant Disease* 73: 800-803.
- Kedara, C. J., Leslie, J. F. y Claflin, L. E. 1994. **Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalk.** *Phytopathology* 84: 603-607.

- Klittich C. J. R. y Leslie, J. F. 1988. **Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)**. *Genetics* 118: 417-423.
- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- Lima, C. S., Monteiro, J. H., Crespo, A. N., Costa, C. S. S., Leslie, J. F., y Pfenning, L. H. 2009. **VCG y AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil**. *European Journal of Plant Pathology* 123: 17-26.
- López-Estrada, M. E., Acosta-Rodríguez, M. C., Otero-Colina, G., Michel-Aceves, A. C. y Noriega-Cantú, D. H. 2008. **Manejo de plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) obtenidas in vitro para estudios de sanidad vegetal**. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 184-187.
- McDonald, B. A. and Martinez, J. P. 1990. **DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field**. *Phytopathology* 80:1368-1373.
- Marzluf, G. A. 1997. **Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- Ploetz, R. C. 2006. ***Fusarium*-Induced disease of tropical, perennial crops**. *Phytopathology* 96:648-652.
- Puhalla, J. 1985. **Classification of strains of *Fusarium* on basis of vegetative compatibility**. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.
- Rodríguez-Alvarado, G., Betancourt-Resendes, I., Rodríguez-Fernández, R., Velázquez-Monreal, J. J., Fernández-Pavía, S. P., y Gómez-Dorantes, N. 2013. **Vegetative compatibility groups characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation in Jalisco, Mexico**. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31. En prensa.

DISCUSIÓN GENERAL

El hallazgo de *F. decemcellulare* y *F. pseudocircinatum* en un mismo tejido de mango sugiere que estos patógenos coexisten en el tejido, aunque el tipo de interacción entre ambos se desconoce. *F. pseudocircinatum* se ha encontrado asociado a la malformación de mango en México (Otero-Colina *et al.* 2010). Mientras que *F. decemcellulare* causa un desorden escamoso de la corteza y muerte descendente en mango (Ploetz y Freeman, 2009) y en otros hospedantes (Ploetz, 2006). La ocurrencia de estas dos especies en el mismo brote malformado de mango en Tecomán, Colima, podría explicar la sintomatología atípica encontrada en los árboles afectados. Las malformaciones que mostraron los árboles se desarrollaron a partir de yemas en los entrenudos del tallo. Mientras que generalmente las malformaciones floral y vegetativa de mango se desarrollan en yemas apicales (Ploetz y Freeman, 2009).

La interacción entre especies de *Fusarium* que causan malformación de mango ha sido poco estudiada aun cuando se han detectado varias especies en un mismo país, en África del Sur se encontró a *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*, mientras que en Brasil fueron *F. sterilihyphosum* y *F. tuiense* sp. nov. (Marasas *et al.* 2006; Lima *et al.* 2009). En México se descubrieron dos taxones en un mismo estado (Quezada-Gutierrez, 2011). En maíz se han realizado estudios de coinfección por *F. graminearum* y *F. moniliforme*, esta última especie se encontró en plantas a las que se les había inoculado el primer patógeno por lo que se reportó que *F. moniliforme* estaba de manera natural en el tejido (Reid *et al.* 1999). En el trabajo de esta tesis se detectaron otros *Fusarium* (*Fusarium* sp. y *F. pseudocircinatum*) en las plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MXCOL 113 y *F. mexicanum*. López-Estrada (2008) propone utilizar plantas de mango obtenidas in vitro para este tipo de estudios donde se tenga la certeza que estén libres de especies de *Fusarium*. Investigadores brasileños mencionan que ellos antes de realizar inoculaciones de *Fusarium* en mango, realizan un muestreo al azar de yemas en dormancia para detectar *Fusarium* en medio de cultivo (Lima, 2011 comunicación personal).

Los estudios de heterocariones que ocurren en la naturaleza son escasos (Caten y Jinks, 1966), y no existen reportes en la literatura científica de estudios de heterocariosis *in planta* utilizando mutantes *nit*. Sin embargo se han utilizado mutantes *nit* para el estudio de cepas patogénicas en *F. oxysporum* (Hadar y

Katan, 1989). El estudio con cepas mutantes puede ser una herramienta útil en el estudio de interacciones entre cepas de *Fusarium* causante de la malformación del mango.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Para establecer medidas adecuadas del manejo y control de la malformación de mango en campo, es necesario conocer las especies de *Fusarium* que se encuentran en una misma huerta. Tomando en cuenta los aspectos de este trabajo más de una especie puede estar presente en un mismo tejido. También es importante conocer el tipo de interacción que existe entre las especies de *Fusarium* que se detecten asociadas. Es necesario estudiar si las especies de *Fusarium* que infectan mango producen algún tipo de micotoxinas y su efecto en la salud animal debido a que el mango es utilizado como árbol forrajero. Además es importante tener un buen manejo en la producción de plántula en vivero debido a que *Fusarium* puede permanecer en el tejido de mango sin causar los síntomas de la enfermedad. Para ello es necesario establecer un método de diagnóstico en plantas de mango que no muestran síntomas de malformación para evitar diseminar el patógeno en las zonas productoras de mango.

LITERATURA COMPLEMENTARIA

- Adachi, and Tsuge, T. 1994. **Coinfection by different isolates of *Alternaria alternata* in single black spot lesions of Japanese pear leaves.** *Phytopathology* 84: 447-451.
- Betancourt-Resendes, I., Velázquez-Monreal, J. J., Montero-Castro, J. C., Fernández-Pavía, S. P., Lozoya-Saldaña, H. y Rodríguez-Alvarado, G. 2013. ***Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 31. En prensa.
- Britz, H., T. E. Steenkamp, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, B. F. Marasas y M. J. Wingfield. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation.** *Mycology* 94: 722-730.
- Burnett, J. 2003. **Fungal Populations and Species.** Pp. 162-184. Oxford University Press. New York, USA.
- Caten, C. E. and Jinks, J. L. 1966. **Heterokaryosis: Its significance in wild homotallicacomycetes and fungi I perfecti.** *Transactions of the British. Mycological Society* 49: 81-93.
- Chávez, C. X., Vega, P. A., Tapia, V. L. M., y Miranda, S. M. A. 2001. **Mango, su manejo y producción en el trópico seco de México.** Libro Técnico No. 1. Campo Experimental Valle de Apatzingán. CIRPAC. INIFAP. México. 108 p.
- Hadar, E. y Katan, T. 1989. **The use of nitrate-nonutilizing mutants and selective medium for studies of pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*.** *Plant Disease* 73: 800-803.
- Kumar, J., Singh, U. S., and Beniwal, S. P. S. 1993. **Mango malformation: one hundred years of research.** *Annual Review of Phytopathology* 31: 217-232.
- Kumar, P., Misra, K. A., y Modi, D. R. 2011. **Current status of mango malformation in India.** *Asian Journal of Plant Sciences* 10: 1-23.
- Kvas, M., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Steenkamp, E. T. 2009. **Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex.** *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Leslie, J. F. 1995. ***Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits.** *Canadian Journal of Botany* 73: S282-S291.

- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 pp.
- Lima C. S., Pfenning L. H., Costa M. A., and Leslie J. F. 2009. **A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil**. *Plant Pathology* 17-26.
- López-Estrada, M. E., Acosta-Rodríguez, M. C., Otero-Colina, G., Michel-Aceves, A. C. y Noriega-Cantú, D. H. 2008. **Manejo de plántulas de mango (*Mangifera indica* L.) obtenidas in vitro para estudios de sanidad vegetal**. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 184-187.
- MacNeill, B. H. and Chilton, S. 1981. **Genetic exchange between prototrophic strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. *Canadian Journal of Plant Pathology* 3: 197-200.
- Marasas, W. F. O., Ploetz, R. C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., and Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species**. *Phytopathology* 96: 667-672.
- Mukherjee, S. K. and Litz, R. E. 2009. **Introduction: Botany and Importance**. En: *The Mango*, 2nd Edition: Botany, Production and Uses. (Ed. R. E. Litz). CAB International. Oxfordshire, UK.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. **Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Mycologia* 90: 465-493.
- Otero-Colina, G., G. Rodríguez, S. Fernández, M. Maymon, R. C. Ploetz, T. A. Aoki, K. O'Donnell and S. Freeman. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in México, *Fusarium mexicanum* sp. nov.** *Phytopathology* 100: 1176-1184.
- Ploetz, R. C. 2001. **Malformation: a unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L.** In: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D. and Bryden, W.L. (eds). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. American Phytopathological Society (APS) Press, St Paul, Minnesota, pp. 233–247.
- Ploetz, R. C. 2003. **Diseases of mango**. In: **Ploetz, R.C. (ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 327–363.

- Ploetz, R. C. 2006. ***Fusarium*-Induced disease of tropical, perennial crops.** *Phytopathology* 96:648-652.
- Ploetz, R. C. and Freeman, S. 2009. **Foliar, Floral and Soilborne Diseases.** In: Litz, R. E. (ed.). *The Mango. Botany, Production and Uses.* Second Edition. CAB International.
- Quezada-Gutiérrez, M. C. 2011. **Análisis de poblaciones de *Fusarium* asociadas con malformación de mango en Colima.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.
- Reid, L. M., Nicol, R. W., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J. D., Young, J. C., Stewart, D. W and Schaafsma, A. W. 1999. **Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation.** *Phytopathology* 89: 1028-1037.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C, and Valenzuela-Vázquez, M. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico.** *Plant Pathology* 57:781.
- SIAP-SAGARPA 2011. (servicio de información agroalimentaria y pesquera) http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado en marzo 2011).
- Steenkamp, E. T., Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O. and Wingfield, M. J. 2000. **Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation.** *Molecular Plant Pathology* 1:187-193.
- Zhan, R.-L., Yang, S.-J., Ho, H.-H., Liu, F., Zhao, Y. L., Chang, J.-M., and He, Y.-B. 2010. **Mango malformation in South China caused by *Fusarium proliferatum*.** *Journal of Phytopathology* 158: 721-725.
- Zheng, Q. and Ploetz, R. 2002. **Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay.** *Plant Pathology* 51:208-216.

ANEXOS

Anexo I. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se prepararon en volúmenes de 250 mL de la siguiente manera: los ingredientes de los medios se pesaron y colocaron en frascos de 500 mL, fueron agregados 250 mL de agua destilada, se disolvieron en horno de microondas, y esterilizaron en una autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 20 min. Al finalizar la esterilización se colocaron en baño María a 49°C hasta que el medio se estabilizó a esa temperatura. Posteriormente, los medios se vaciaron en cajas Petri 100 x 15 mm o 60 x 15 mm, en una cámara de flujo laminar. Las cajas Petri con medio se almacenaron en bolsas de plástico cerradas a 25°C hasta su uso.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) ½X Fresco. Para preparar este medio se utilizaron papas frescas, con menos de una semana de almacenamiento. Se pesaron 31.25 g de rebanadas de papa de 0.5 cm de espesor aproximadamente, se colocaron en una olla con 250 mL de agua destilada e hirvieron a fuego lento hasta su cocción. Consecutivamente, la infusión obtenida se filtró con 2 capas de gasa en embudo y aforó con agua destilada hasta obtener un volumen final de 250 mL. La infusión se vació en un frasco de vidrio de 500 mL, se agregaron 2.5 g de dextrosa y 5 g de agar bacteriológico. Antes de vaciar el medio en cajas petri se le agregó 500 µL de cada antibiótico (0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina) con el propósito de inhibir el crecimiento de contaminantes bacterianos.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) 1X Fresco. Para este medio se utilizaron papas frescas, con menos de una semana de almacenamiento. Se pesaron 62.5 g de rebanadas de papa de 0.5 cm de espesor aproximadamente, se colocaron en una olla con 250 mL de agua destilada y se hirvieron a fuego lento hasta su cocción. Posteriormente, la infusión obtenida se filtró con 2 capas de gasa y se aforó con agua destilada hasta obtener un volumen final de 250 mL. La infusión se vació en un frasco de vidrio de 500 mL, se agregaron 5 g de dextrosa y 5 g de agar.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) 1X Deshidratado. Para este medio se pesaron 9.75 g de agar dextrosa y papa (BD Bioxon), se colocaron en un frasco de 500 mL y se agregó 250 mL de agua destilada estéril.

Medio Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). Para preparar 250 mL de este medio se utilizaron los siguientes compuestos: 0.250 g de Fosfato de Potasio (KH_2PO_4), 0.250 g de Nitrato de Potasio (KNO_3), 0.125 g de Sulfato de Magnesio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.125 g de Cloruro de Potasio (KCl), 0.05 g de Glucosa, 0.05 g de Sacarosa y 5 g de agar bacteriológico. Después de que el medio se solidificó en las cajas de petri de 60 x 15 mm, se colocaron en el centro de la caja sobre el medio rectángulos de papel filtro Whatman estéril de aproximadamente 1 cm².

Agar Agua 2% (AA). Para este medio se utilizaron 5 g de agar bacteriológico y aforó con agua destilada hasta 250 mL, posteriormente se disolvió en horno de microondas, y esterilizó en la autoclave.

Medio Agar Clavel (CLA). Para su preparación se vació medio estéril agar agua al 2% en cajas de Petri 60 x 15 mm que contenían 3 a 5 trozos de hojas de clavel esterilizadas con radiación gama de aproximadamente 5 mm².

Medio Basal. Modificado por Correllet *al.* (1986). Se preparó de acuerdo al protocolo descrito por Leslie y Summerell (2006).

Medio Mínimo. A un litro de medio basal se le agregaron 2 g de nitrato de sodio (NaNO_3).

Medio Mínimo + Hipoxantina (Hy). A un litro de medio basal se le agregaron 0.2 g de hipoxantina.

Medio Mínimo + TartratodeAmonio (Am). A un litro de medio basal se le agregó 1.6 g de tartrato de amonio.

ANEXO II. AISLAMIENTO DE *Fusarium* DE TEJIDO DE MANGO CON MALFORMACIÓN. OBTENCIÓN DE UN AISLAMIENTO POR MUESTRA

Se obtuvo una muestra de tejido con malformación vegetativa y/o malformación floral por árbol. En el laboratorio se procesó una muestra de tejido de aproximadamente 5 cm². La muestra se lavó con agua de la llave y jabón, posteriormente se colocó en una solución de jabón neutro (Hisiclyn ®) al 10 % durante 5 min, después fue colocada en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6 % durante cinco minutos. El tejido fue secado con toallas de papel estériles. Se realizaron cortes transversales del tejido (explantos) de aproximadamente 1 cm y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6 % durante 2 min y finalmente se secaron con toallas de papel estériles. Los explantos se sembraron en cajas con medio PDA fresco ½ X suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente en obscuridad. Las colonias miceliales emergidas del tejido que presentaron crecimiento típico de *Fusarium* fueron transferidas por punta de hifa a cajas con medio SNA (un aislamiento por muestra) y se incubaron a 24° C ±1 bajo luz blanca y negra con un fotoperiodo de 12 h.

ANEXO III. AISLAMIENTO DE *Fusarium* DE TEJIDO DE MANGO CON MALFORMACIÓN. OBTENCIÓN DE AISLADOS POR DILUCIONES SERIADAS

Se obtuvo una muestra de tejido con malformación vegetativa y/o malformación floral por árbol. El tejido se lavó con agua corriente y jabón, y se realizaron cortes del tejido de aproximadamente 1 mm². Los explantos fueron desinfestados como se mencionó en la sección anterior. Los explantos desinfestados fueron colocados en un mortero con 1 mL de agua destilada y se maceraron hasta obtener una suspensión (dilución 10⁰). Quinientos µL de la suspensión se transfirieron a un tubo de ensaye con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 10⁻¹), el tubo se agitó manualmente. Fueron transferidos 500 µL a otro tubo con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 10⁻²). Los tubos fueron agitados manualmente, se colocaron 25 µL de cada dilución (10⁰, 10⁻¹ y 10⁻²) en cajas de Petri 100 x 15 mm con medio de cultivo suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. La suspensión se esparció en el medio con una varilla de vidrio. Las cajas fueron incubadas a 24 °C ±1 en oscuridad.

Anexo IV. Características morfológicas de macroconidios y microconidios de aislados de *Fusarium* obtenidos de árboles con malformación en Colima.

Aislado	Macroconidio			Microconidio	
	Longitud (µm)	Ancho (µm)	° Septos	Longitud (µm)	Ancho (µm)
MXCOL 228	39.6	4.3	3	14	4.9
MXCOL 229	37	4.2	3	13.5	4.3
MXCOL 230	39.2	4.6	3	14.5	4.7
MXCOL 231	35.6	3.7	3	13.4	4.3
MXCOL 232	36.3	3.6	3	10.4	2.5
MXCOL 233	39.2	4.4	3	14.4	2.5
MXCOL 234	35.7	3.4	3	12.1	3.2
MXCOL 236	45	4.4	3	13	3.6
MXCOL 238	36.5	2.5	3	12.2	4.6
MXCOL 239	35.6	4.8	3	8	2.5
MXCOL 240	37	2.5	3	12.8	5
MXCOL 242	92.5	8.3	7 a 9	10.9	4.8
MXCOL 248	82.2	8.1	7	10.8	5
MXCOL 249	87.7	8.1	6 a 9	10.8	5
MXCOL 252	86.2	7.6	6 a 8	11.8	4.5

Anexo V. Caracterización morfológica en CLA de aislados de *Fusarium* obtenidos de árboles de mango con malformación en Jalisco.

Aislado	Macroconidio		Microconidio		Hifas enrolladas estériles
	Tamaño µm	Nº de septos	Forma	Tamaño µm	
MXJAL-20	43.8 x 5.1	3	Oval	11 x 3.3	-
MXJAL-21	37.5 x 5	3	Oval	4.2 x 2.5	-
MXJAL-22	34.6 x 2.5	3	-	-	-
MXJAL-23	44.7 x 5	3	Oval/ reniforme	9.7 x 2.8	+ ^b
MXJAL-24	42.5 x 5.6	3	Oval	10.6 x 3.8	+
MXJAL-25	33.1 X 5	3	Oval	11.1 x 2.5	-
MXJAL-26	34.1 x 5	3	Oval	10.2 x 3.8	-
MXJAL-27	36.7 x 3.1	3	Oval	9 x 2.5	-
MXJAL-28	- ^a	-	Oval	8.5 x 2.5	-
MXJAL-29	38 x 6.4	3	Oval	8.3 x 2.5	-
MXJAL-30	41.5 x 5	3	Oval	9.4 x 2.5	-
MXJAL-31	53.8 x 5	3 a 6	Oval	9.4 x 3.2	-
MXJAL-32	47.6 x 5	3	Oval	9.3 x 2.9	-
MXJAL-33	60.2 x 5	3 a 5	Oval	9.8 x 2.5	-
MXJAL-34	-	-	Oval	10.1 x 2.7	+
MXJAL-35	29.68 x 5	3	Oval/ ovoide	9.7 x 2.5	+
MXJAL-36	56.5 x 6.85	3 a 5	Oval	10.4 x 5.4	-
MXJAL-37	32 x 4.85	3	Oval	10.7 x 3.05	+
MXJAL-38	34 x 6	3	Oval/ reniforme	11 x 3.2	-
MXJAL-39	46.5 x 6.75	3	Oval/ ovoide	9.9 x 3.15	-
MXJAL-40	37.2 x 5.45	3	Oval/ ovoide	9.8 x 5.35	+
MXJAL-41	43.2 x 6.5	3	Oval	10.8 x 2.8	+
MXJAL-42	44.2 x 6.8	3	Oval/ ovoide	10.4 x 5.2	-
MXJAL-43	42.5 x 7.15	3	Oval	10.5 x 5	-
MXJAL-44	52 x 6.65	3 a 5	Oval	9.8 x 5	-
MXJAL-45	53.38 x 6.99	5	Oval	12.19 x 3.59	-
MXJAL-46	56.2 x 5.95	3 a 5	Oval	9.6 x 5.15	+
MXJAL-47	55.7 x 7.05	3 a 5	Oval	10.3 x 3.7	+
MXJAL-48	-	-	Oval	9.6 x 5.15	-
MXJAL-49	-	-	Oval	9.4 x 5.35	-

^aNo se observaron

^bSe observaron en al menos una preparación

ANEXO VI. Análisis Blast para aislados de *Fusarium* obtenidos de árboles de mango con malformación en Colima.

Aislado	Accesión	Descripción	Máx. identidad	Origen	Hospedante
^a Grupo I	GU737398.1	<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 53570	100%	Guerrero, Mex	<i>Mangifera indica</i>
	GU737399.1	<i>F. pseudocircinatum</i> strain NRRL 53573	99%	Campeche, Mex	<i>M. indica</i>
	AF160271.1	<i>F. pseudocircinatum</i> strain NRRL 22946	99%	No conocido	No conocido
	GQ425230.1	<i>F. pseudocircinatum</i>	100%	Indonesia	<i>Vanilla planifolia</i>
	JF740710.1	<i>F. pseudocircinatum</i> strain NRRL 25034	97%	No conocido	No conocido
	DQ435349.1	<i>F. pseudocircinatum</i> strain NRRL 53570	97%	Australia	No conocido
^b Grupo II	AB674295.1	<i>Nectria rigidiuscula</i>	98%	No conocido	No conocido
	HM625870.1	<i>N. rigidiuscula</i> isolate FA-SHPZH03	97%	No conocido	<i>M. indica</i>
	HM625869.1	<i>N. rigidiuscula</i> isolate FA-SHPZH02	97%	No conocido	<i>M. indica</i>
	HM625868.1	<i>N. rigidiuscula</i> isolate FA-SHPZH01	97%	No conocido	<i>M. indica</i>
	DQ295125.1	<i>N. rigidiuscula</i> isolate F0015	97%	No conocido	No conocido

^aAislados que pertenecen a este grupo: MXCOL-228, MXCOL- 229, MXCOL-230, MXCOL-231, MXCOL-232, MXCOL-233, MXCOL-234, MXCOL-236, MXCOL-237, MXCOL-238 y MXCOL-240.

^bAislados que pertenecen a este grupo: MXCOL 242, MXCOL-248, MXCOL-249 y MXCOL-252.