



**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

**FUENTES DE INÓCULO DE ESPECIES DE *Fusarium*
CAUSANTES DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO (*Mangifera
indica* L.)**

**TESIS QUE PRESENTA
BIOL. ALEJANDRO SOTO PLANCARTE**

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

**Asesor: PhD. Gerardo Rodríguez Alvarado
Co-asesora: PhD. Sylvia Patricia Fernández Pavía**

Morelia, Michoacán, agosto de 2013

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 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 se realizó gracias a la generosa colaboración de muchas personas a quienes expreso mis más sinceros agradecimientos.

*Extiendo mi más sincero agradecimiento al **Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado**, Director de la presente tesis, por sus sugerencias, valiosos y buenos consejos, por encaminarme en el camino de la ciencia y sobre todo por su apoyo, conocimientos, orientación y valiosas aportaciones para la conclusión de la misma.*

*A la **Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía** que es un gran ser humano, por sus valiosas y oportunas aportaciones, recomendaciones, conocimientos y sugerencias para la conclusión de este trabajo de tesis.*

*A los integrantes del comité revisor: **Dr. Javier Villegas Moreno**, **Dr. Miguel Martínez Trujillo**, **Dr. Joaquín Velázquez Monreal**, a la **Dra. Sylvia P. Fernández Pavía** y al **Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado** quienes con sus valiosas aportaciones, consejos, apoyo y buenas sugerencias se perfecciono la calidad de este trabajo de tesis.*

*A mis seres queridos. A mis compañeras del laboratorio con quienes compartí grandes momentos: **Ana Luisa**, **Carmen Quezada Gutiérrez**, **Núria Gómez Dorantes**, **Marlene Díaz Celaya**, **Rosario Gregorio Cípriano**, por brindarme su apoyo y compartir experiencias durante la realización de mi trabajo de tesis. Especialmente a mis mejores amigos **Fernando** y **Adrián**, a mi amigo **Isaí Betancourt**, por brindarme su amistad, apoyo y con quienes compartí muchas cosas académicas y personales durante nuestros estudios.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Malformación	6
Dinámica de la infección de <i>Fusarium mangiferae</i>	8
Plantas asociadas al mango	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
CAPÍTULO I. DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD	
MALFORMACIÓN EN VIVEROS DE MANGO	13
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1.1 INTRODUCCIÓN	15
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	17
1.2.1 Incidencia de malformación en viveros comerciales de mango	17
1.2.2 Obtención de aislados de <i>Fusarium</i>	17
1.2.3 Cultivos monospóricos	17
1.2.4 Caracterización cultural y morfológica	18
1.2.5 Caracterización genética	19
1.3 RESULTADOS	21
1.3.1 Incidencia de malformación en plantas de mango en condiciones de invernadero	21
1.3.2 Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> de tejidos malformados de plantas de mango de vivero	24
1.3.3 Caracterización cultural y morfológica de aislados de <i>Fusarium</i>	26

de tejidos malformados de plantas de mango de vivero	
1.3.4 Identificación utilizando secuencias del gen nuclear factor de elongación 1 α	27
1.4 DISCUSIÓN	29
1.5 CONCLUSIONES	32
1.6 LITERATURA CITADA	33
CAPÍTULO II. ESPECIES DE <i>Fusarium</i> ASOCIADAS A TEJIDOS MALFORMADOS DE MALEZAS Y PLANTAS ARBUSTIVAS EN COLIMA Y MICHOACÁN	37
RESUMEN	37
ABSTRACT	39
2.1 INTRODUCCIÓN	40
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.2.1 Muestreo de plantas con malformación	42
2.2.2 Obtención de aislamientos de <i>Fusarium</i>	42
2.2.3 Cultivos monospóricos	43
2.2.4 Preservación de cultivos monospóricos	43
2.2.5 Caracterización cultural y morfológica	44
2.2.6 Obtención de micelio para extracción de ADN	44
2.2.7 Extracción de ácidos nucleicos y caracterización genética	44
2.3 RESULTADOS	46
2.3.1 Detección de plantas silvestres con síntomas de malformación y obtención de aislados de <i>Fusarium</i>	46
2.3.2 Identificación de los aislados mediante técnicas moleculares	52
2.3.3 Caracterización cultural y morfológica de aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de malezas y plantas arbustivas silvestres	54
2.4 DISCUSIÓN	57
2.5 CONCLUSIONES	62
2.6 LITERATURA CITADA	63
DISCUSIÓN GENERAL	67

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	69
LITERATURA COMPLEMENTARIA	70
ANEXOS	73
Anexo I. Viveros muestreados y en los que se determinó la incidencia de malformación del mango en los estado de Guerrero y Michoacán.	
Anexo II. Preparación de medios de cultivo.	75
Anexo III. Características morfológicas de macroconidios y microconidios de aislados de <i>Fusarium mexicanum</i> obtenidos de mango en condiciones de vivero.	77
Anexo IV. Análisis Blast en GenBank utilizando secuencias del aislado MICV-52.	78
Anexo V. Análisis Blast en GenBank utilizando secuencias del aislado MICV-40.	78
Anexo VI. Alineamiento de secuencias del factor de elongación de aislados MICV-40 y MICV-52.	79
Anexo VII. Características morfológicas de los aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de malezas y plantas arbustivas de los estados de Michoacán y Colima.	80
Anexo VIII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado COLMW-6. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de <i>Fusarium</i> depositadas en GenBank.	81
Anexo IX. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-22a. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de <i>Fusarium</i> depositadas en GenBank.	82
Anexo X. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-5a. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de <i>Fusarium</i> depositadas en GenBank.	83
Anexo XI. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias	83

del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-16d. Máxima identidad de 99 al 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Anexo XII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-1a. Máxima identidad de 99 al 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

84

Anexo XIII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMM-2. Máxima identidad de 99 al 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

85

ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1. Incidencia de plantas de mango con malformación en viveros de los estados de Michoacán y Guerrero. 2011-2012.	23
Cuadro 2. Aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de plantas de viveros de mango de los estados de Michoacán y Guerrero. 2011-2012.	24
Cuadro 3. Especies de <i>Fusarium</i> aisladas de tejidos malformados de plantas de mango y silvestres en Colima y Michoacán.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Síntomas de malformación floral en mango.	7
Figura 2. Ciclo propuesto de la enfermedad malformación del mango causado por el patógeno <i>Fusarium mangiferae</i> . Tomado de: Gamliel-Atinsky, <i>et al.</i> 2009. Infection dynamics of <i>Fusarium mangiferae</i> , causal agent of mango malformation disease. <i>Phytopathology</i> 99:775-781.	9
Figura 3. Plantas de mango de vivero. A , Inflorescencia sana. B , Inflorescencia con malformación. C , Brote apical vegetativo sin síntomas. D , Brote apical con malformación vegetativa.	22
Figura 4. Características morfológicas de aislados de <i>Fusarium mexicanum</i> obtenidos de plantas de mango en vivero con malformación. A . Microconidios. B , C . Falsas cabezas en monofialides. D , E . Falsas cabezas en polifialides. F . Macroconidios típicos de <i>Fusarium</i> .	27
Figura 5. <i>Swietenia</i> sp. Síntomas de malformación vegetativa.	48
Figura 6. Árbol de identidad desconocida. Síntomas de malformación en las ramas.	49
Figura 7. <i>Bursera</i> sp. Síntomas de malformación floral.	50
Figura 8. <i>Tabebuia</i> sp. Síntomas de malformación vegetativa con engrosamiento de los brotes apicales.	51
Figura 9. <i>Senna occidentalis</i> . Malformación vegetativa.	52

FUENTES DE INÓCULO DE ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO (*Mangifera indica* L.)

RESUMEN GENERAL

El mango es uno de los frutales de mayor importancia en México. Sin embargo, la producción de este cultivo es severamente afectada por la enfermedad malformación en todas las áreas productoras del país. Este tipo de problema fitosanitario es el más importante de este frutal en Michoacán, donde se estima que reduce la producción de mango del 40 al 50%. Varias especies del género *Fusarium* se han identificado asociadas a esta enfermedad en el ámbito mundial. Reportes previos mencionan que *F. mexicanum* es el patógeno prevalente en la región centro-occidente de México. A la fecha, se desconoce cuáles son los principales modos de entrada de este hongo en huertas comerciales de mango. El objetivo de este trabajo fue determinar las fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en áreas productoras de la región del país ya mencionada. Se visitaron viveros de mango en los estados de Guerrero y Michoacán para detectar y coleccionar muestras de plantas con síntomas de malformación. También se obtuvieron muestras de malezas y plantas arbustivas con tejidos malformados y/o agallas en huertas de mango y áreas cercanas a éstas. Se encontraron plantas de mango con síntomas de malformación en 10 viveros. Se identificó a *F. mexicanum* en todas las muestras coleccionadas. Este resultado sugiere que esta especie está siendo diseminada por medio de plantas de mango infectadas de vivero a huertos comerciales. Por otra parte, se detectaron plantas con síntomas de agallas y/o malformación en los estados de Colima y Michoacán en las siguientes especies: *Bursera* sp., *Senna occidentalis*, *Swietenia*, *Tabebuia* y un árbol de identidad desconocida. Se obtuvieron 41 aislados de *Fusarium* a partir los tejidos malformados. En base a la caracterización morfológica, cultural y amplificación por PCR de secuencias del gen de la traducción del factor de elongación-1 α y análisis Blast, los aislados se identificaron como *F. lactis*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*. Este es el primer reporte de estas especies de *Fusarium* asociadas con tejidos malformados de malezas y plantas arbustivas en México. Si estos patógenos son endémicos en

una región, estas malezas y plantas arbustivas silvestres podrían servir como hospedantes alternantes y/o como fuentes de inóculo en áreas donde se cultiva mango. Además, el comercio informal de plantas de mango, la falta de regulación fitosanitaria y la introducción de plantas de vivero de mango producidas en otros estados, podrían facilitar la diseminación de los patógenos causantes de la malformación de un estado a otro en el país.

INOCULUM SOURCES OF *Fusarium* SPECIES CAUSING MANGO (*Mangifera indica* L.) MALFORMATION

GENERAL ABSTRACT

Mango is one of the most important fruit crops in Mexico. However, the production of this crop is severely affected by the malformation disease in most growing areas of the country. Mango malformation is the most important disease in the state of Michoacan for this fruit crop. Mango production in Michoacan is reduced from 40 to 50% by the malformation disease. Several species of the genus *Fusarium* have been associated to this disease in the world. Previous reports mention that *F. mexicanum* is the prevalent pathogen in the central western region of Mexico. So far, it is unknown how *F. mexicanum* is introduced into commercial mango orchards. The objective of this research was to determine the inoculum sources of *Fusarium* species that cause mango malformation in producing areas in the central western region of Mexico. Mango nurseries in the states of Guerrero y Michoacan were visited to detect and collect samples of plants with malformation symptoms. Also, samples of weeds and trees with malformed tissues and/or galls present or in nearby areas of mango orchards, were collected. Mango plants with malformation symptoms were detected in ten nurseries. *F. mexicanum* was identified in every sample. This result suggests that *F. mexicanum* is being disseminated by means of infected plants from mango nurseries to mango commercial orchards in the central western region of México. Moreover, plants with malformation and/or galls symptoms were detected in the states of Colima and Michoacán in the following plant species: *Bursera* sp., *Senna occidentalis*, *Swietenia*, *Tabebuia*, and an unidentified tree. Forty one *Fusarium* isolates were obtained from malformed tissues. Based on cultural and morphological characterization, and PCR amplification of sequences of the translation elongation factor-1 α gen and a Blast analysis, the isolates were identified as *F. lactis*, *F. mexicanum*, and *F. pseudocircinatum*. This is the first report of these *Fusarium* species associated with malformed tissues of weeds and trees in Mexico. If these pathogens are endemic in a region, these wild weeds and trees could act as alternative hosts and/or inoculum sources in areas where mango is cultivated. Also,

the informal commerce of mango plants, the lack of phytosanitary regulations and the introduction of infected mango plants from other states, could facilitate the dissemination of the pathogens causing malformation from one state to another in the country.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutícolas de mayor importancia en el mundo. México se encuentra dentro de los primeros diez productores a nivel internacional (FAOSTAT, 2012). La superficie establecida con esta especie 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 reporta un promedio de 13.47 ton/ha, en Michoacán éste es de 6.15 ton/ha (SIAP-SAGARPA, 2011). La producción de mango en México se ve afectada por diversos factores incluyendo una alta incidencia de enfermedades (Chávez *et al.* 2001). Dentro de éstas las 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).

La malformación del mango es la enfermedad más importante de este cultivo, causada por varias especies del hongo *Fusarium*, la cual se encuentra diseminada en todas las áreas productoras del mundo (Ploetz, 2003). Aún cuando existen numerosos estudios, todavía se desconocen muchos aspectos básicos sobre este problema. Se han hecho grandes esfuerzos por controlarlo; sin embargo, en la actualidad, no existe algún método efectivo que por sí solo lo disminuya significativamente. Se ha sugerido la implementación de un manejo integrado de la enfermedad que incluya poda fitosanitaria, fertilización al suelo, aspersiones de fungicidas, acaricidas, reguladores de crecimiento y otros compuestos químicos para tratar de reducir su incidencia y severidad (Kumar *et al.* 1993).

A la fecha, se desconoce el origen de las especies de *Fusarium* asociadas con la malformación del mango (Marasas *et al.* 2006). *F. mangiferae* y otro taxón de este género han sido detectados en países del sur de Asia e India (Britz *et al.* 2002, Marasas *et al.* 2006). Debido a que el mango es originario de la India, tipos monoembriónicos, y del sudeste Asiático, tipos poliembriónicos (Mukherjee, 1997), es posible que *F. mangiferae* y taxones asociados hayan evolucionado como

patógenos de alguno o ambos tipos de este frutal (Marasas *et al.* 2006). Se sabe que *F. mangiferae* puede permanecer latente en tejidos asintomáticos de mango, lo cual podría favorecer su diseminación a huertas cuando se utilizan plantas y/o yemas infectadas provenientes de viveros infectados (Ploetz, 1994). En el caso de *F. sterilihyphosum*, se considera que este taxón se originó en el continente americano (O'Donnell *et al.* 1998), lo cual, si es correcto indicaría que su hospedante original no era mango (Marasas *et al.* 2006).

Malformación

Los árboles enfermos presentan malformaciones tanto en los brotes florales (panículas) como vegetativos. En las panículas malformadas se presenta un incremento en el número de flores masculinas, mientras que las flores hermafroditas producidas son estériles o si se fertilizan abortan posteriormente. Esta sobreproducción de flores incrementa el peso y tamaño de la panícula (Figura 1). El grado de infección varía de un árbol a otro y de una rama a otra en un mismo árbol. Además, es común observar diversos grados de severidad en la sintomatología de las inflorescencias malformadas, así como inflorescencias sanas y malformadas en la misma rama (Ploetz, 2003). Por otra parte, en la malformación vegetativa se observa una ausencia de dominancia del brote apical lo que resulta en un engrosamiento de las yemas vegetativas axilares y proliferación de un gran número de hojas muy pequeñas. Las ramas con este tipo de malformación generalmente no producen inflorescencias. Las plántulas de mango en viveros que desarrollan síntomas severos de engrosamiento en el ápice, permanecen achaparradas y eventualmente mueren.



Figura 1. Síntomas de malformación floral en mango.

Como ya se señaló la malformación del mango es causada por varias especies del hongo *Fusarium* (Marasas *et al.* 2006). En estudios filogenéticos de aislamientos obtenidos de tejidos malformados de este cultivo en Sudáfrica se detectaron dos grupos distintos al utilizar secuencias de los genes de la histona y β -Tubulina. Por una parte, un grupo representaba un linaje no descrito con anterioridad del complejo *Gibberella fujikuroi*, mientras que el segundo era co-específico con aislamientos previamente reportados como causantes de la malformación en mango (Steenkamp *et al.* 1999, 2000). Estudios sobre la morfología de ambos grupos utilizando aislamientos obtenidos de tejidos malformados de mango en diversas áreas geográficas del mundo, indicaron que los aislamientos podían agruparse taxonómicamente en tres grupos; uno que incluía los aislamientos llamados *F. subglutinans* procedentes de Egipto, Florida (EUA), Israel, Malasia y Sudáfrica para el cual se propuso el nombre de *F. mangiferae* (Britz *et al.* 2002). El segundo grupo correspondió a los aislamientos de Brasil y Sudáfrica para los que se estableció el nombre de *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.* 2002). El grupo restante incluyó tres aislamientos obtenidos en Malasia para el cual no se propuso un nombre (Marasas *et al.* 2006). En Michoacán, México, se detectó la presencia de aislamientos de *Fusarium* patogénicos en plántulas de mango, con morfología similar a *F. sterilihyphosum* (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008). Estos aislamientos son diferentes filogenéticamente de otras especies de *Fusarium* por lo que se le ha denominado *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010). En Brasil se ha encontrado un linaje nuevo de

aislamientos tipo *F. subglutinans* al cual se le ha nombrado *F. tuiense* como el principal agente causal de la malformación del mango en Brasil (Lima *et al.* 2009, Lima *et al.* 2012).

Dinámica de la infección de *Fusarium mangiferae*

En la actualidad se desconocen muchos aspectos básicos sobre la epidemiología de la malformación del mango (Kumar *et al.* 1993). Sin embargo, estudios recientes con *F. mangiferae* demuestran que el sitio de infección del hongo ocurre principalmente en los brotes apicales de las plantas y en menor proporción en los brotes laterales. Mientras que la colonización interna del tejido en las ramas infectadas es mayor en los nudos con brotes laterales que en las zonas de entrenudos (Gamliel-Atinsky *et al.* 2009b). Las inflorescencias malformadas secas sirven como fuente de propágulos de *F. mangiferae* hacia las partes que están debajo de los tejidos enfermos, y por el viento son diseminados hacia árboles vecinos (Gamliel-Atinsky *et al.* 2009a, Youssef *et al.* 2007). Cuando los semilleros de plantas de mango se establecen a la sombra de árboles de mango con malformación, las plantas llegan a presentar hasta un 97% de incidencia de colonización por *F. mangiferae*, principalmente en los meristemas apicales (Youssef *et al.* 2007, 2009, Prasad *et al.* 1972). Hipotéticamente las fuentes principales de dispersión del patógeno a grandes distancias son a través de plántulas cultivadas en huertos con la enfermedad, o de plantas infectadas de viveros (Youssef *et al.* 2009, Gaur y Chakrabarti. 2009, Prasad *et al.* 1972, Rymbai y Rajesh. 2011).

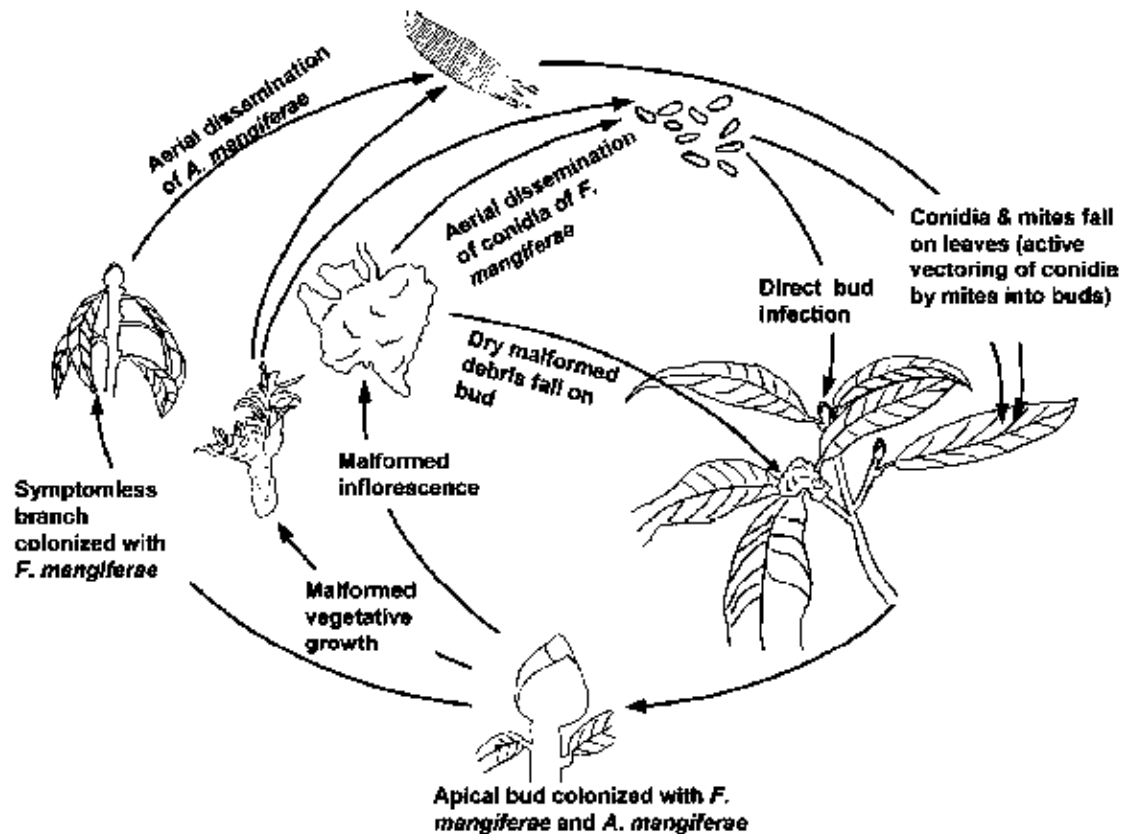


Figura 2. Ciclo propuesto de la enfermedad malformación del mango causado por el patógeno *Fusarium mangiferae*. Tomado de: Gamliel-Atinsky, *et al.* 2009. Infection dynamics of *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. *Phytopathology* 99:775- 781.

Plantas asociadas al mango

En su área de distribución natural en la región de Myanmar (Burma) el mango crece en bosques caducifolios húmedos secundarios en una posición codominante, junto con *Anthocephalus chinensis* (Lam.) A. Rich ex Walp., *Alstonia scholaris* R. Br., *Dillenia pentagyna* Roxb., *Schleichera trijuga* Willd., *Terminalia tomentosa* W. & A., *Bursera serrata* Colebr., *Melia composita* Willd. y *Bridelia retusa* Spreng. En el oeste de Bengala (India), el mango se encuentra asociado con *Butea monosperma* (L.) Taubert, *Madhuca latifolia*, *Pterocarpus macrocarpus* Kunz y *Shorea robusta* Gaertn. (Champion, 1936, citado por Parrotta, 1993). La siembra de cultivos junto con el mango como cereales, leguminosas, hortalizas, papaya, piña y otros, se practica comúnmente durante los primeros 3 ó 4 años después de establecida la plantación, o

hasta que la copa se cierra (Galán, 1990). Durante las etapas tempranas de desarrollo, el crecimiento de los árboles puede tener competencia con gramíneas, cultivos bajos y otros tipos de vegetación herbácea, tal como sucede en la región de Apatzingán, Michoacán en huertos establecidos donde las principales malezas identificadas son huinare (*Melochia pyramidata* L.), zacate cola de zorra (*Leptochloa filiformis* (Lam) Blau V), zacate Johnson (*Sorghum halepense* (L.) Pers), pingüica (*Aldama dentata* La Llave & Lex) y timbuque (*Cenchrus ciliaries* L.) (Chávez *et al.* 2001).

HIPÓTESIS

Las plantas de mango producidas en viveros comerciales así como plantas silvestres como malezas y otro tipo de árboles, son fuente de inóculo de especies de *Fusarium* causantes de malformación del mango en huertas comerciales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar las posibles fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en áreas productoras de la región centro-occidente de México.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia e incidencia de plantas de mango con malformación en viveros comerciales e identificar las especies de *Fusarium* que la causan.
2. Determinar la identidad de las especies de *Fusarium* que ocasionan la malformación floral y/o vegetativa en malezas y plantas arbustivas presentes en áreas productoras de mango de la región centro-occidente.

CAPÍTULO I.

DETECCION E INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD MALFORMACIÓN EN VIVEROS DE MANGO

RESUMEN

El mango es uno de los frutales de mayor importancia en México. Este cultivo es afectado por la enfermedad malformación, cuyos síntomas se presentan en los brotes florales y vegetativos. La cual es causada por varias especies del hongo *Fusarium*, y se encuentra diseminada en la mayoría de las áreas productoras del mundo. El objetivo de esta investigación fue determinar si plantas de mango producidas en viveros comerciales en Guerrero y Michoacán, son una fuente de inóculo y diseminación de especies de *Fusarium* causantes de la enfermedad. Se muestrearon 18 viveros de mango en Guerrero y Michoacán durante 2011 y 2012. En diez viveros de Michoacán se observaron plantas con síntomas de malformación floral y vegetativa. Se determinó la incidencia de la enfermedad en cada vivero y se colectaron muestras. Se obtuvieron 33 aislados de *Fusarium* de los tejidos malformados. En base a sus características culturales, morfológicas y genéticas, los aislados fueron identificados como *F. mexicanum*. El análisis de las secuencias de ADN del factor de elongación (EF-1 α) mostraron 100% de identidad con aislados de *F. mexicanum* de Jalisco y Morelos previamente reportados. Los viveros visitados en el estado de Guerrero no presentaron plantas de mango con malformación. Estos resultados indican que algunos viveros de plantas de mango en Michoacán, podrían estar diseminando plantas infectadas con *F. mexicanum*. Es necesario establecer mejores medidas de control sanitario en la producción de plantas de mango en el estado.

ABSTRACT

Mango is one of the most fruit crops in Mexico. This plant is affected by the malformation disease, which symptoms appear in the floral and vegetative shoots. This disease is caused by several species of the fungus *Fusarium*, and the disease is present in most of the mango producing areas in the world. The purpose of this research was to determine if mango plants produced in commercial nurseries in Guerrero and Michoacan, act as an inoculum and dissemination source of the *Fusarium* species causing mango malformation. Eighteen mango nurseries in Guerrero and Michoacan were sampled during 2011 and 2012. In ten nurseries located in Michoacan, plants were observed with symptoms of floral and vegetative malformation. The incidence of the disease was calculated in each nursery and samples were taken. Thirty three isolates of *Fusarium* were obtained from the malformed tissues. Based on the cultural, genetic and morphological characteristics, the isolates were identified as *F. mexicanum*. Analysis of the elongation factor gene (EF-1 α) sequences using the Blast (NCBI) program, showed 100% identity with *F. mexicanum* isolates from Jalisco and Michoacan, previously reported. These results indicate that some mango nurseries in Michoacan could be disseminating plants infected with *F. mexicanum*. It is necessary to establish sanitary measures in the production of mango plants in the state.

1.1 INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutícolas de mayor importancia en el mundo (Mukherjee y Litz 2009). México ocupa el sexto lugar en producción a nivel mundial y segundo en exportación (FAO 2012). El mango es uno de los frutales de mayor importancia económica en el estado Michoacán, ocupando el sexto lugar en producción nacional, antecedido por los estados de Chiapas, Guerrero, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa. Los rendimientos que se obtienen en las diferentes regiones del país varían. Así, mientras que en Guerrero se obtiene un promedio de 13.47 ton/ha, en Michoacán es de los más bajos del país con 6.15 ton/ha, ya que se encuentra por debajo de la media nacional de 8.75 ton/ha (SIAP-SAGARPA, 2011).

La malformación del mango es la enfermedad más importante en la mayoría de las áreas productoras en el ámbito mundial (Kumar *et al.* 1993, Ploetz y Freeman 2009). Este problema se registró por primera vez en 1891 en la India (Kumar *et al.* 2011). En 1958 se detectó en Veracruz y posteriormente en Morelos y Guerrero, en los cultivares manila y criollo (Chavéz *et al.* 2001). En la actualidad, la malformación se encuentra en la mayoría de los estados productores de las regiones del Golfo de México y centro occidente (Chavéz *et al.* 2001, Morales y Rodríguez 1961, Mora *et al.* 1998).

Los síntomas que la enfermedad induce en plantas de mango son: deformación en brotes florales, acortamiento de los ejes primarios y secundarios de las panículas, e incremento en el número de flores masculinas. La mayoría de las flores hermafroditas que se producen son estériles; mientras que las pocas que son fecundadas abortan y no producen frutos. Además, ocurre deformación en brotes vegetativos, presentando entrenudos acortados, las hojas son delgadas, pequeñas y quebradizas (Marasas *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2011).

Se ha reportado que la enfermedad malformación puede ser diseminada a nuevas áreas por medio de plántulas de vivero. Especialmente cuando éstas son

cultivadas debajo de árboles de mango con la enfermedad (Youssef *et al.* 2009, Kumar *et al.* 1993, Prakash y Srivastava, 1987, Ploetz *et al.* 2002).

En el estado de Michoacán la malformación es la enfermedad más importante del mango. Se estima que este problema en este estado reduce la producción del 40 al 50% (Vega y Miranda, 1993). Debido al comercio informal e introducción de plantas de vivero de mango producidas en otros estados y a la falta de regulación fitosanitaria, esto podría facilitar la diseminación de patógenos de un estado a otro en el país.

La malformación del mango se considera como un factor limitante para el establecimiento de huertas económicamente viables en algunos estados de México (Vega y Miranda 1993). A pesar de su importancia, existe poca información sobre diversos aspectos de esta enfermedad, tales como métodos efectivos de control, modos de dispersión del patógeno y niveles de tolerancia o resistencia en los cultivares comerciales. Actualmente, se ha determinado que la malformación del mango es causada por varias especies del hongo *Fusarium* (Marasas *et al.* 2006). *F. mangiferae* ha sido detectado en Egipto, Florida (EUA), Israel, Malasia y Sudáfrica (Britz *et al.* 2002); *F. sterilihyphosum* encontrado en Brasil y África del Sur (Britz *et al.* 2002; Zheng y Ploetz 2002); *F. tuiense* recientemente reportado en Brasil (Lima *et al.* 2009, Lima *et al.* 2012), *F. proliferatum* reportado en China (Zhan *et al.* 2010); y *F. mexicanum*, detectado inicialmente en Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008), y posteriormente descubierto en Colima, Guerrero y Morelos (Otero-Colina *et al.* 2010).

El objetivo de esta investigación fue determinar si plantas de mango producidas en viveros comerciales en Guerrero y Michoacán, son una fuente de inóculo y diseminación de especies de *Fusarium* causantes de la enfermedad malformación.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Incidencia de malformación en viveros comerciales de mango

Se muestrearon 18 viveros comerciales de plantas de mango ubicados en los estados de Guerrero y Michoacán durante el 2011 y 2012 (Anexo I). En los viveros que presentaron plantas con síntomas de malformación, se colectaron muestras para llevar a cabo aislamientos del patógeno. Se estimó el total aproximado de plantas por vivero. Se determinó la incidencia de malformación en los viveros observando un mínimo de 100 plantas por vivero. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se almacenaron en una hielera con hielo para su traslado al laboratorio.

1.2.2 Obtención de aislados de *Fusarium*

Las muestras obtenidas en vivero se procesaron de acuerdo a protocolos establecidos (Leslie y Summerell, 2006) para obtener aislados de *Fusarium* presentes en los tejidos malformados de mango. Inicialmente, de cada muestra se seleccionó un trozo de tejido, éste se lavó con agua jabonosa por 5 minutos para remover polvo, ácaros e insectos. El tejido se transfirió a una solución de cloro comercial (Cloralex) diluida al 10%, en donde se mantuvo por 5 min. Se enjuagó en agua destilada estéril para remover el exceso de cloro. A continuación el tejido se secó con papel absorbente estéril. Se cortaron discos de tejido de 0.5 a 1 mm de espesor, y se colocaron de 4 a 5 en cajas Petri de 100 x 15 mm con medio PDA diluido suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. Las cajas con los explantos se incubaron a 25° C por 24 a 48 h. Posteriormente, se transfirió un bloque de medio de aproximadamente 0.5 mm³ con puntas de hifas del micelio que surgió de cada explanto, a cajas Petri con medio SNA para inducir esporulación. Los medios de cultivo utilizados para realizar aislamientos, caracterización cultural, morfológica y genética se describen en el Anexo II.

1.2.3 Cultivos monospóricos

Para purificar los aislados se utilizó la técnica de cultivo monospórico y/o punta de hifa. Se tomaron 3 discos (6 mm de diámetro) de medio SNA con micelio de

cultivos activos. Los discos se colocaron en un tubo de vidrio con 5 mL de agua destilada estéril y se agitó varias veces para obtener una suspensión de conidios. A partir de este tubo (dilución 10^0) se transfirió 500 μ L de manera seriada a tubos con 4.5 mL de agua destilada estéril para preparar diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . Se tomaron 30 μ L de cada una de éstas y se colocó sobre la superficie de medio AA al 2% en el centro de cajas Petri 100 x 15 mm. La suspensión fue dispersada con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 25° C en completa oscuridad por 20 horas para inducir la germinación de conidios. Posteriormente, las cajas se observaron al microscopio estereoscópico para ubicar los conidios germinados, los cuales primeramente de manera individual se obtuvieron cortando un bloque de medio de 1 mm³ aproximadamente y se transfirieron a cajas con medio SNA. Éstas se incubaron bajo luz blanca y negra a 25° C, por un periodo de 7 a 10 días para inducir esporulación. Al terminar el periodo de incubación, se agregaron 2 a 3 mL de glicerol al 25% estéril al crecimiento micelial en cada caja de cultivo y con una varilla de vidrio estéril, se desprendieron los conidios del micelio para formar una suspensión en el glicerol. Alícuotas de esta suspensión de conidios se transfirieron a viales criogénicos, los cuales se almacenaron a -70° C. Todos los experimentos que se llevaron a cabo con los aislados, se iniciaron utilizando alícuotas de las suspensiones de conidios en glicerol al 25 % mantenidas a ultra baja temperatura.

1.2.4 Caracterización cultural y morfológica

Los aislados se incubaron a 25° C en los medios PDA, PDA deshidratado, SNA y CLA, bajo luz continua blanca y negra. Las observaciones y mediciones se llevaron a cabo después de 10 a 14 días de incubación. Para determinar las características culturales de los aislados, se observó el tipo y color de micelio producido por los aislados en medio PDA y PDA deshidratado después de 10 días de incubación (Nirenberg 1981, Aoki y Nirenberg 1999, Nirenberg y O'Donnell 1998).

Para determinar las características morfológicas de los aislados, se hicieron preparaciones en porta y cubreobjetos con agua destilada, las cuales se observaron en un microscopio compuesto (Carl Zeiss). Para cada aislado se realizaron

mediciones de 25 macroconidios y 25 microconidios. Se determinó el número de septos, longitud, ancho, forma y tipo de fiálide, de acuerdo a los protocolos descritos por Leslie y Summerell (2006).

1.2.5 Caracterización genética

Los aislados de *Fusarium* se crecieron en tubos cónicos de 50 mL de capacidad que contenían 25 mL de medio mínimo sin agar. Se le agregaron a cada tubo 3 discos de 6 mm³ de medio CLA con micelio y se crecieron 6 días en obscuridad (Leslie y Summerell 2006) a una temperatura de 25°C para obtener abundante micelio. El cual se colectó en un embudo con tela Miracloth (Calbiochem) estéril y se lavó 2 veces con 100 mL de agua destilada estéril. El micelio obtenido se depositó en cajas Petri de 100 x 15 mm y sobre éste se colocó una toalla de papel absorbente estéril y fue deshidratado en una incubadora a 29°C durante 6 horas, después se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y almacenó a -20°C.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo del micelio molido utilizando un kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit. Promega). Se amplificaron secuencias del gen factor de elongación (EF-1 α) utilizando los oligonucleótidos EF-1 y EF-2 descritos por O'Donnell *et al.* (1998a), de acuerdo al protocolo descrito por Quezada-Gutiérrez (2011). Los fragmentos amplificados de ADN se purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega).

El análisis de los fragmentos amplificados de ADN se hizo a través de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con 1X TAE a 50 volts por 90 minutos para determinar el grado de amplificación. El ADN purificado se envió a la compañía Macrogen (Seúl, Corea de Sur) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas para cada aislado se editaron usando el programa Mega 5.10 (Tamura *et al.* 2011) para generar secuencias consenso. Las cuales se alinearon a secuencias publicadas en el GenBank utilizando el programa Blast 2.2.19 (Zhang *et al.* 2000; NCBI. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar

porcentajes de similitud y tratar de identificar los aislados de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de plantas de mango de viveros comerciales.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Incidencia de malformación en plantas de mango en condiciones de invernadero.

Se trabajó en 18 viveros comerciales de plantas de mango ubicados en los estados de Michoacán y Guerrero durante el 2011 y 2012. El número total de plantas en los 18 viveros fue de 225,941 (Anexo I). Se observaron 197 plantas de mango con síntomas de malformación floral o vegetativa (Cuadro 1). Las plantas con síntomas tenían edades de 3 a 36 meses de edad, e intervalo de altura de 50 a 300 cm (Figura 3). Los cultivares que presentaron plantas con malformación se indican en el Cuadro 2. El cultivar criollo presentó el mayor número de plantas con síntomas de malformación. En la mayoría de los cultivares se detectó malformación vegetativa, excepto en el cultivar Keitt en el que se encontraron 9 plantas con malformación floral y 4 con malformación vegetativa. Se colectaron 51 muestras de plantas que presentaban síntomas de malformación vegetativa o floral.



Figura 3. Plantas de mango de vivero. **A**, Inflorescencia sana. **B**, Inflorescencia con malformación. **C**, Brote apical vegetativo sin síntomas. **D**, Brote apical con malformación vegetativa

Cuadro 1. Incidencia de plantas de mango con malformación en viveros de los estados de Michoacán y Guerrero. 2011-2012.

No. Vivero	Cultivar	Plantas con malformación	Incidencia de la enfermedad por vivero
I	Kent	6	7/2.2%
	Criollo	1	
II	Criollo	10	21/0.36%
	Kent	11	
III	Criollo	2	2/0.2%
IV	Criollo	41	41/25.7%
V	Kent	3	24/1.77%
	Haden	4	
	Criollo	17	
XIII	Criollo	2	2/3.27%
XV	Criollo	7	7/0.5%
XVI	Criollo	54	54/12.3%
XVII	Criollo	1	1/0.003%
XVIII	Haden	9	38/2.8%
	Criollo	15	
	Ataulfo	1	
	Keitt	13	

1.3.2 Obtención de aislados de *Fusarium* de tejidos malformados de plantas de mango de vivero

Se obtuvieron 33 aislados de *Fusarium*, los cuales fueron analizados cultural, morfológica y genéticamente. De éstos, 30 aislados (90.9%) procedieron de tejidos vegetativos malformados, en tanto que sólo tres (9.1%) eran de tejido floral (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislados de *Fusarium* obtenidos de plantas de viveros de mango de los estados de Michoacán y Guerrero. 2011-2012.

No. Vivero	Cultivar	Malformación	Código
I	Kent	Vegetativa	MICV-6
IV	Criollo	Vegetativa	MICV-20
IV	Criollo	Vegetativa	MICV-21
IV	Criollo	Vegetativa	MICV-22
IV	Criollo	Vegetativa	MICV-23
IV	Criollo	Vegetativa	MICV-24
V	Kent	Vegetativa	MICV-25
V	Kent	Vegetativa	MICV-26
V	Kent	Vegetativa	MICV-27
V	Haden	Vegetativa	MICV-28
V	Criollo	Vegetativa	MICV-29
XIII	Criollo	Vegetativa	MICV-30
XIII	Criollo	Vegetativa	MICV-31
XV	Criollo	Vegetativa	MICV-33

XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-39
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-40
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-41
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-42
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-43
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-44
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-45
XVI	Criollo	Vegetativa	MICV-46
XVII	Criollo	Vegetativa	MICV-47
XVIII	Haden	Vegetativa	MICV-48
XVIII	Haden	Vegetativa	MICV-49
XVIII	Haden	Vegetativa	MICV-50
XVIII	Keitt	Floral	MICV-51
XVIII	Keitt	Floral	MICV-52
XVIII	Keitt	Floral	MICV-53
XVIII	Keitt	Vegetativa	MICV-54
XVIII	Ataulfo	Vegetativa	MICV-55
XVIII	Criollo	Vegetativa	MICV-56
XVIII	Criollo	Vegetativa	MICV-57

1.3.3 Caracterización cultural y morfológica de aislados de *Fusarium* de tejidos malformados de plantas de mango de vivero.

Los aislados de *Fusarium* obtenidos a partir de tejido de mango con malformación y que fueron analizados presentaron micelio aéreo y abundante, con variaciones de color blanco a rosa y violeta, en PDA fresco. Mientras que en PDA deshidratado el micelio mostró una coloración violeta a blanco. Además, los aislados pigmentaron de color púrpura a violeta o violeta a salmón el medio PDA fresco. Mientras que en medio PDA deshidratado la pigmentación vario de salmón a púrpura y a crema.

Las características morfológicas que presentaron los aislados fueron las siguientes (Figura 4; Anexo III): Los microconidios fueron producidos en falsas cabezas, en mono y polifiálides. La forma fue variada siendo principalmente ovales, clavados a elipsoides, y algunos en forma de riñón. La mayoría tenía septos ausentes o solo uno. Las dimensiones que tuvieron fue longitud de 5 a 20 μm y ancho de 2.5 a 5 μm . Todos los aislamientos produjeron microconidios.

Los macroconidios tenían la forma de canoa, típica del género *Fusarium*; es decir, con una curvatura dorsiventral. Con una célula apical acuminada formando un pico angosto y una célula basal en forma de pie. Presentaron de tres a cinco septos, aunque en la mayoría se observaron únicamente tres. Las dimensiones que tenían estas estructuras fueron una longitud de 25 a 65 μm , mientras que el ancho fue de 2.5 a 6.25 μm . (Anexo II). En tres aislados no se observaron macroconidios; mientras que éstos fueron escasos en algunos aislados. Los aislados no produjeron clamidosporas en las cajas de medio de cultivo que se utilizaron para la caracterización cultural y morfológica.

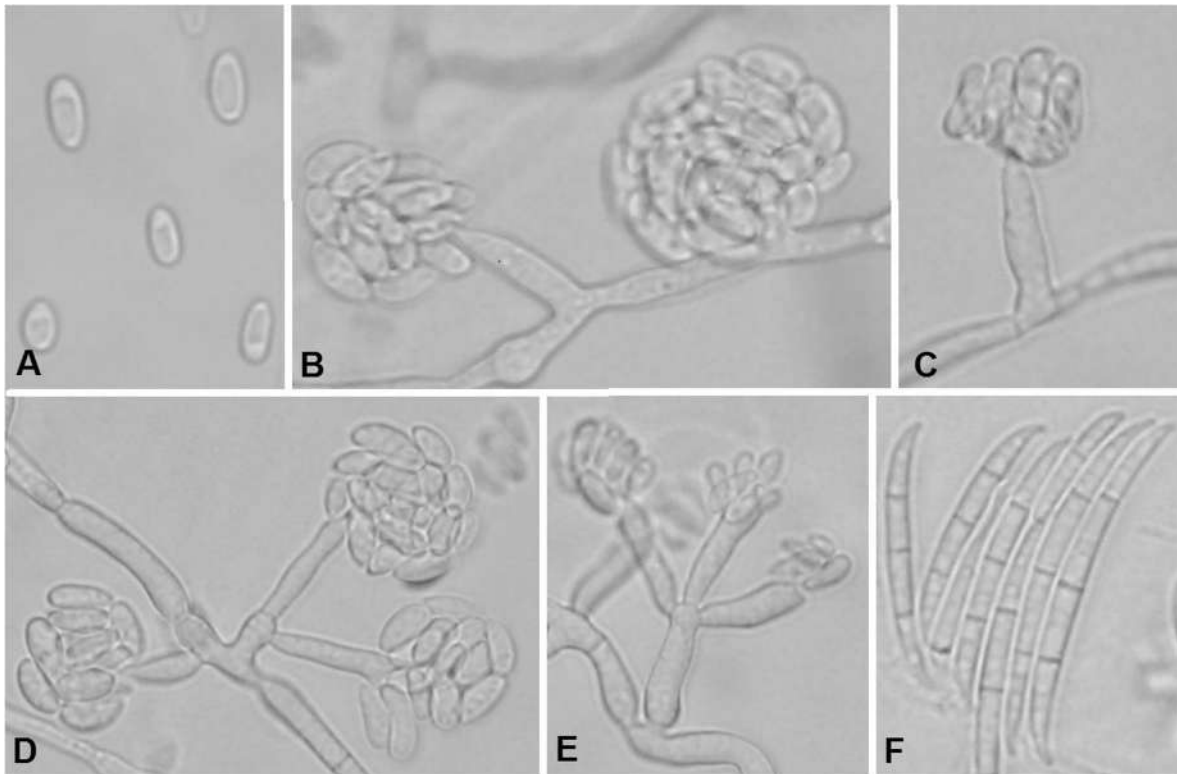


Figura 4. Características morfológicas de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de plantas de mango en vivero con malformación. **A.** Microconidios. **B, C.** Falsas cabezas en monofialides. **D, E.** Falsas cabezas en polifialides. **F.** Macroconidios típicos de *Fusarium*.

1.3.4 Identificación utilizando secuencias del gen nuclear factor de elongación 1 α .

Para confirmar la identidad del patógeno obtenido a partir de tejido de mango con malformación, se empleó ADN genómico de los aislados de *Fusarium* en reacciones de PCR, para amplificar un fragmento del gen factor de elongación (TEF-1 α). Los productos obtenidos (677 pb) fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por medio de una compañía externa (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Las secuencias resultantes se editaron con los programas del paquete Staden para obtener las secuencias consenso. Posteriormente, éstas se compararon con secuencias de cepas de *Fusarium* almacenadas en el GenBank usando el programa

Blastn (NCBI). El resultado del análisis Blastn (Anexo IV) indicó que las secuencias de los aislados obtenidos de plantas de mango de viveros presentaban 100% de similitud con las correspondientes a las cepas de *Fusarium mexicanum* NRRL 53135, NRRL 53136, MXJAL-13, MXJAL-3 y MXJAL-8. Todas estas cepas fueron aisladas de tejidos malformados de árboles de mango en huertas de los estados de Michoacán y Jalisco (Otero-Colina *et al.* 2010, Betancourt-Resendes 2010).

Solamente el aislado MICV-40 mostró diferencias en la secuencia del gen factor de elongación, con respecto al resto de los aislados obtenidos de plantas de mango de viveros (Anexo V). La secuencia de este aislado presentó tres posiciones con nucleótidos diferentes. Sin embargo, el resultado del análisis Blastn en el GenBank reveló 100% de similitud con secuencias de diversas cepas de *F. mexicanum*: NRRL 53575, MXJAL-17, MXJAL-14, MXJAL-7, MXJAL-4, MXJAL-19, MXJAL-18, MXJAL-6, MXJAL-5, MXJAL-1, MXJAL-2, MXJAL-11 y MXJAL-10 (Anexo VI). Estas cepas fueron obtenidas de árboles de mango con malformación en los estados de Jalisco y Morelos (Otero-Colina *et al.* 2010, Betancourt-Resendes *et al.* no publicado).

1.4 DISCUSIÓN

En este estudio se determinó si viveros comerciales de árboles frutales en Guerrero y Michoacán, presentaban plantas de mango con síntomas de malformación así como la incidencia de la enfermedad en los mismos. Se detectaron plantas con síntomas de malformación, principalmente vegetativa, en 10 (55.5%) viveros de 18 visitados. Solamente viveros estudiados en Michoacán mostraron plantas con la enfermedad; los viveros trabajados en Guerrero no presentaron plantas con síntomas. La incidencia total de plantas con síntomas en los 10 viveros fue de 0.5%. Sin embargo, este dato puede no reflejar la situación real en los viveros, ya que en aquellos con cantidades elevadas de plantas presentaron números bajos de plantas con síntomas. Mientras que los viveros pequeños presentaron números altos de plantas enfermas. El número de plantas enfermas detectadas fue similar al reportado en viveros de diversas regiones de la India. Singh *et al.* (1961) encontraron 0.8% de incidencia en plántulas de 5 meses de edad. Sin embargo; en tanto que Kumar y Beniwal (1992) reportaron 10% de incidencia. Por otra parte, Gaur y Chakrabarti (2009) observaron 0.7 a 4.25% de incidencia en plántulas jóvenes, y de 0.5 a 67.3% en plantas de 1 año de edad.

La mayoría de los viveros de tamaño pequeño en los cuales se detectaron plantas de mango con malformación, se encuentran ubicados dentro o adyacentes a huertos del mismo cultivo. En algunos casos, las plantas en estos viveros estaban protegidas de la excesiva radiación solar por árboles de mango que presentaban malformación floral y/o vegetativa. Youssef *et al.* (2009), en un estudio llevado a cabo en viveros de mango en Egipto, detectaron *F. mangiferae* en el meristemo apical de 97% de las plántulas de este frutal analizadas; mientras que aislaron al patógeno a partir de raíces de solamente el 5% de las plantas analizadas. Los viveros estudiados estaban localizados en huertas de mango con árboles que presentaban síntomas de malformación. Es una práctica común en Egipto establecer viveros de plantas de este cultivo en las mismas huertas del mismo frutal, las cuales generalmente presentan árboles con malformación. Situaciones similares se han reportado en plantas de vivero de la India y Pakistán (Kumar *et al.* 1993). Algunos autores

consideran que esta situación propicia que las plántulas sean infectadas por *F. mangiferae*, y que posteriormente, las mismas contribuyan a la diseminación del patógeno a huertas comerciales de mango (Youssef *et al.* 2007, 2009; Ploetz *et al.* 2002; Rymbai y Rajesh 2011). Además, según información proporcionada por los viveristas, las malformaciones que aparecen en las plantas de viveros son removidas y posteriormente esas mismas plantas son ofertadas como sanas a los agricultores. Se ha reportado que *F. mangiferae* puede permanecer latente en tejidos vegetativos de mango, lo cual podría favorecer su diseminación a huertas cuando se utilizan plantas de vivero con infecciones asintomáticas (Ploetz, 1994).

Se analizaron 33 aislados obtenidos de tejidos malformados de plantas de mango de viveros del estado de Michoacán. En los viveros del estado de Guerrero no se detectaron plantas de mango con síntomas. Las características de color de micelio que presentaron los aislados son similares a las reportadas para *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010). La variación observada en el color del micelio de algunos de ellos puede deberse a las condiciones experimentales diferentes en las que se llevan a cabo los estudios (Summerell *et al.* 2003, Leslie y Summerell, 2006).

Las características morfológicas de los aislados de *Fusarium* de viveros también concuerdan con la descripción reportada para *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010). Sin embargo, en algunos aislados no se observaron macroconidios en medio de cultivo SNA bajo luz. Se ha reportado que algunas cepas de especies de *Fusarium* solamente son capaces de formar macroconidios en obscuridad (Aoki y Nirenberg, 1999).

Los resultados del análisis genético revelaron que las secuencias del gen factor de elongación obtenidas de los 33 aislados de *Fusarium* en este estudio, son idénticos con secuencias de *F. mexicanum* depositadas en el Genbank (NCBI). La mayoría de ellos presentan 100% de identidad con dos aislados reportados por Otero-colina *et al.* (2010) para Michoacán, y con otros tres consignados por

Betancourt-Resendes *et al.* (2013) procedentes de Jalisco. Únicamente el aislado MICV-40 presenta diferencias en la secuencia del factor de elongación; sin embargo, tuvo 100% de identidad con secuencias de 12 aislados adicionales de Jalisco (Betancourt- Resendes *et al.* 2013) así como con un aislado del estado de Morelos (Otero-colina *et al.* 2010). Se requiere realizar un estudio genético más amplio con secuencias de genes adicionales, para poder determinar el origen geográfico y filogenético de los aislados de *F. mexicanum* detectados en viveros de Michoacán.

Este estudio mostró que plantas de mango con síntomas de malformación producidas en algunos viveros de Michoacán, podrían ser una fuente de inóculo de especies patogénicas de *Fusarium* a huertas comerciales de mango. Además, plantas de mango infectadas con *F. mexicanum*, podrían ser transportadas a diferentes lugares fuera del estado, debido al comercio informal, facilitando la diseminación de patógenos causantes de la malformación de un estado a otro del país. Es necesario el establecimiento de normas sanitarias para evitar la dispersión de este y otros patógenos del mango en las diferentes regiones productoras de México. Los productores deberían ser asesorados en estrategias para producir plantas sanas.

1.5 CONCLUSIONES

- 1) Se identificó a *Fusarium mexicanum* asociado con tejidos malformados de plantas de mango en viveros de Michoacán. Los viveros trabajados del estado de Guerrero no presentaron plantas con síntomas de la enfermedad.

- 2) Las plantas de mango producidas en vivero son probablemente una fuente de inóculo y diseminación de especies de *Fusarium* causantes de la malformación.

1.6 LITERATURA CITADA

- Aoki T. y H. I. Nirenberg. 1999. ***Fusarium globosum* from subtropical Japan and the effect of different light conditions on its conidiogenesis.** *Mycoscience* 40: 1-9.
- Betancourt-Resendes, I. 2010. **Compatibilidad vegetativa de *Fusarium mexicanum* agente causal de la malformación de mango en Jalisco.** Tesis Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 73 pp.
- 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., Steenkamp, E. T., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O. y Wingfield, M. J. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation.** *Mycologia* 94: 722-730.
- 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. INIFAP. 108 p.
- FAO, 2012. Food and Agriculture Organization Statistical Database Internet. <http://faostat.fao.org/default.aspx> (Accesada en diciembre de 2012).
- Gaur V. P. y Chakrabarti, D. K. 2009. **Incidence of malformation in mango (*Mangifera indica*) nurseries in eastern Uttar Pradesh.** *Indian Journal of Agricultural Sciences* 79: 160-162.
- Kumar, J. y Beniwal, S. P. S. 1992. **Mango malformation.** In: J. Kumar, H. S. Chaube, U.S. Singh y A. N. Mukhopadhyay (eds.), *Plant Diseases of International Importance. Diseases of Fruit Crops. Vol. 3.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp.357-393.
- Kumar, J., Singh, U. S., y 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.

- Leslie J. F. y Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, U. S. A. 388 pp.
- Lima, C. S., Pfennig, L. H., Costa, S. S., Campos, M. A., y 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., Pfennig, 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., y Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species**. *Phytopathology* 96: 667–672.
- Morales E. y Rodríguez, H. 1961. **Breves anotaciones sobre una nueva plaga en árboles de mango. México**. *Fitófilo* 1: 7-11.
- Mora, A. A., Vega, P.A., y Téliz, D. 1998. **Enfermedades del mango**. pp 18-44. En: GIIM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango). El mango y su Manejo Integrado en Michoacán. Daniel Téliz, Ed. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Mukherjee S. K. y Litz, R. E. 2009. **Introduction: Botany and Importance**. In: Litz RE (ed.). The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. CAB International.
- Nirenberg H. I. 1981. **A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat**. *Canadian Journal of Botany*. 59: 1599-1609.
- Nirenberg H. I. y O'Donnell, K. 1998. **New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Mycologia* 90: 434-458.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., y Nirenberg, H. I. 1998a. **Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Mycologia* 90: 465-493.
- Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Maymon, M., Ploetz, R.C., Aoki, T., O'Donnell, K., y Freeman, S. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation**

- disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology* 11: 1176-1184.
- Ploetz, R. C. 1994. **Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation.** *Canadian Journal of Botany* 72: 7-9.
- Ploetz, R., Zheng, Q. I., Vazquez, A. y Abdel Sattar, M. A. 2002. **Current status and impact of mango malformation in Egypt.** *International Journal of Pest Management* 48: 279-285.
- 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.
- Prakash, O. y Srivastava, K. C. 1987. **Mango Diseases and their Management - A World Review.** Tommorrow's Printer, New Delhi. 175 pp.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Ploetz, R. C., y Valenzuela-Vázquez, M. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, México.** *Plant Pathology* 57:781.
- Rymbai, H. y Rajesh, A. M. 2011. **Mango malformation: a review.** *Life sciences Leaflets* 22:1079-1095. <http://lifesciencesleaflets.ning.com/> (Accesada en diciembre de 2012).
- SIAP-SAGARPA. 2011. Cierre de la producción agrícola por estado 2011. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 (Accesada en diciembre de 2012).
- Summerell, B. A., Salleh, B., y Leslie, J. F. 2003. **A utilitarian approach to *Fusarium* identification.** *Plant Disease* 87: 117-128.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods software version 5.10.** *Molecular Biology Evolution* 28: 2731–2739.
- Vega P. A. y Miranda, S. M. 1993. **Distribución incidencia y severidad de la escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.) en el Valle de Apatzingán, Mich.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 11: 1-4.

- Youssef, S. A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., Sztejnberg, A., Shalaby, A. A., y Freeman, S. 2007. **Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt.** *Plant Pathology* 56: 257-263.
- Youssef, S. A., Shalaby, A. A., Sztejnberg, A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., y Freeman, S. 2009. **Malformation presence in mango seedling trees cultivated within infected Egyptian orchards.** *Acta Horticulturae* 820:479-482.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., y Miller, W. 2000. **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *Journal of Computing 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.

CAPÍTULO II.

ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A TEJIDOS MALFORMADOS DE MALEZAS Y PLANTAS ARBUSTIVAS EN COLIMA Y MICHOACÁN

RESUMEN

La enfermedad malformación es el principal factor limitante en la producción de mango en México, ya que afecta a casi todas las regiones productoras de este frutal, causando grandes pérdidas económicas. La enfermedad es ocasionada por varias especies del hongo *Fusarium*. Actualmente se desconocen las fuentes de inóculo del patógeno causantes de este problema fitosanitario. Una posibilidad es que plantas silvestres y ornamentales presentes en zonas de cultivo de mango, sean hospedantes de especies del hongo que causan la enfermedad en huertas comerciales de este cultivo. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Fusarium* que ocasionan la malformación floral y/o vegetativa y agallas, en malezas y plantas arbustivas presentes en áreas productoras de mango en la región centro occidente de México. Se colectaron muestras con malformación vegetativa o floral, y agallas de plantas de las especies *Swietenia* sp., *Bursera* sp., *Tabebuia* sp., *Senna occidentalis*, y de un árbol con identidad desconocida, en Colima y Michoacán. Se obtuvieron 41 aislados fúngicos. En base a las características culturales y morfológicas los aislados fueron identificados como *Fusarium*. El análisis de las secuencias del factor de elongación (EF-1 α) de los aislados, mostraron de 99 a 100% de similitud con tres especies de este hongo: *F. lactis*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*. Se detectó a *F. lactis* en *Swietenia* sp. colectada en Tecomán, Colima y en *S. occidentalis* procedente de La Huacana, Michoacán. Además se encontró a *F. pseudocircinatum* en un árbol de identidad desconocida de Nuevo Urecho, Michoacán, en *Swietenia* sp. procedente de Tecomán, Colima, en *Bursera* sp. y *Tabebuia* sp. de Huetamo y Apatzingán, Michoacán, respectivamente. Así mismo se identificó a *F. mexicanum* en *Swietenia* sp. y *Senna occidentalis* colectadas en La Huacana y Buena Vista Tomatlán, Michoacán, respectivamente. Las plantas silvestres detectadas en este estudio como hospedantes de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango,

podrían ser reservorios de estos patógenos y actuar como fuentes de inóculo hacia huertas de este frutal. La existencia de malezas y árboles silvestres como hospedantes naturales de *F. mexicanum*, indican la necesidad de detectar su presencia en huertos comerciales de mango, y de removerlas como medida de manejo para controlar la malformación en este cultivo.

ABSTRACT

The disease malformation is the main factor limiting mango production in Mexico, affecting most mango producing regions, and causing important economic losses. The disease is caused by several species of the fungus *Fusarium*. The sources of inoculum for *Fusarium* species causing mango malformation are unknown. One possibility is that native and ornamental plants located in mango growing areas act as hosts of the *Fusarium* species causing the disease in the commercial mango orchards. The objective of this study was to identify the species of *Fusarium* causing floral and/or vegetative malformation and galls, in weeds and arbustive plants present in mango producing areas in the central western region of Mexico. Samples with malformed tissues were collected from plants belonging to the species *Swietenia* sp., *Bursera* sp., *Tabebuia* sp., *Senna occidentalis*, and from a tree of unknown identity, from the states of Colima and Michoacan. Forty one isolates were obtained. Based on cultural and morphological characteristics the isolates were identified as *Fusarium*. Analysis of sequences of the elongation factor (EF-1 α) from the isolates, showed 99 to 100% of similitude with three *Fusarium* species: *F. lactis*, *F. mexicanum* and *F. pseudocircinatum*. *F. lactis* was detected in *Swietenia* sp. from Tecoman, Colima and in *S. occidentalis* from La Huacana, Michoacan. *F. pseudocircinatum* was detected in a tree of unknown identity from Nuevo Urecho, Michoacan, in *Swietenia* sp. from Tecoman, Colima, in *Bursera* sp. and *Tabebuia* sp. from Huetamo and Apatzingán, Michoacan, respectively. *F. mexicanum* was detected in *Swietenia* sp. and *Senna occidentalis* from La Huacana and Buena Vista Tomatlan, Michoacan, respectively. The native plants detected in this study as hosts of *Fusarium* species causing mango malformation, could be acting as reservoirs of these pathogens and as inoculum sources for mango orchards. The existence of native weeds and trees acting as natural hosts of *F. mexicanum*, indicate the necessity of detecting its presence in commercial mango orchards, and removing them as a management measure to control mango malformation.

2.1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad malformación del mango está presente en la mayoría de las áreas productoras de este frutal en el ámbito mundial. Aun cuando no existen reportes publicados de su presencia en todos los países productores de África y América, se considera que ha sido ampliamente diseminada en estas regiones debido a la facilidad con que el patógeno puede ser transportado en germoplasma de mango contaminado (Ploetz y Freeman 2009). Diversas especies del hongo *Fusarium* han sido descritas como agentes causales de esta enfermedad (Marasas et al. 2006). *F. mangiferae* Britz, Wingfield and Marasas, ha sido reportado en África del Sur, Egipto, España, Florida (EUA), India, Israel, Malasia, Oman y Sri Lanka (Britz et al. 2002; Crespo et al. 2012; Freeman et al. 1999; Kumar et al. 1993; Kvas et al. 2008; Ploetz et al. 2002; Sinniah et al. 2013; Steenkamp et al. 2000). *F. sterilihyphosum* Britz, Wingfield and Marasas, fue descrito en aislados de África del Sur (Britz et al. 2002) y Brasil (Ploetz 2003; Lima et al. 2009). En tanto que *F. mexicanum* T. Aoki, S. Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz et O'Donnell, fue inicialmente detectado en Michoacán (Rodríguez-Alvarado et al. 2008), y posteriormente en Colima, Guerrero y Morelos (Otero-Colina et al. 2010). *F. tuiense* ha sido identificado en varias regiones de Brasil (Lima et al. 2009; Lima et al. 2012). En tanto que *F. proliferatum* ha sido recientemente reportado en China (Zhan et al. 2010). Los casos de *F. mexicanum* y *F. tuiense* parecen indicar que estas especies están localizadas en México y Brasil, respectivamente. Sin embargo, *F. mangiferae* (Marasas et al. 2006) y *F. sterilihyphosum* podrían haber sido diseminadas de sus centros de origen por el transporte de material contaminado (Ploetz 1994).

A la fecha, se desconoce el origen de las especies de *Fusarium* asociadas con la malformación del mango (Marasas et al. 2006). Sería interesante realizar una búsqueda de hospedantes de especies de *Fusarium* causantes de la malformación en los centros de origen de este cultivo; la India para los tipos monoembriónicos de esa especie; y los países del sudeste Asiático, principalmente Malasia, para los tipos poliembriónicos de la misma (Marasas et al. 2006). En el caso de *F. sterilihyphosum*,

se considera que este taxón se originó en el continente americano (O'Donnell *et al.* 1998a), lo cual, si es correcto indicaría que su hospedante original no sería mango (Marasas *et al.* 2006). La información anterior sugiere que diferentes especies de *Fusarium*, son capaces de causar la malformación del mango en las diferentes áreas geográficas en el ámbito mundial donde se cultiva este frutal. Si esto es cierto, entonces estas especies patogénicas de *Fusarium*, debieron estar presentes en la vegetación local, cuando el cultivo del mango fue llevado a las regiones de América y Asia; como se ha sugerido para *F. sterilihyphosum* (Marasas *et al.* 2006).

Este estudio propone determinar si plantas silvestres, malezas, arbustos y árboles, los cuales presentan síntomas de agallas y/o malformación floral y/o vegetativa, son posibles fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* que inducen la malformación en huertas de mango en los estados de Colima y Michoacán.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Muestreo de plantas con malformación

Se hicieron recorridos de campo en huertas comerciales de mango y áreas cercanas a éstas en varias regiones de los estados de Colima y Michoacán durante el 2011 y 2012. En los sitios donde se observaron plantas arbustivas y malezas con síntomas de algún tipo de malformación o agallas, se obtuvieron muestras vegetativas de ellas para llevar a cabo aislamientos de los hongos que pudieran estar asociados. Se colectaron muestras de mango con malformación de tres huertas comerciales cercanas a los sitios de colecta. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se almacenaron en una hielera con hielo hasta su traslado al laboratorio.

2.2.2 Obtención de aislamientos de *Fusarium*

En el laboratorio las muestras se procesaron de acuerdo a protocolos establecidos para obtener aislamientos de *Fusarium* asociados con los tejidos malformados (Leslie y Summerell, 2006). De cada muestra se seleccionó un trozo pequeño (un cm de longitud) de tejido, generalmente el raquis. Éste se lavó con agua más detergente para remover polvo, ácaros e insectos. A continuación, se colocó en una solución de detergente neutro (Hisiclyn ®) al 10 % durante 5 minutos. El tejido se transfirió a una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ®) diluida al 10%, donde se mantuvo por 5 minutos. Se enjuagó en agua destilada estéril para remover el exceso de hipoclorito de sodio. Enseguida el tejido fue secado con toallas de papel absorbente estériles. Se realizaron cortes transversales del tejido de 0.5 a 1 mm de espesor para obtener explantos, los cuales fueron sembrados en cajas Petri 100 x 15 mm con PDA diluido suplementado con 0.7 g/L de ampicilina y 0.01 g/L de rifampicina. Se sembraron de 4 a 5 explantos por caja. Y enseguida se incubaron a 25° C por 24 a 48 horas. Las colonias de micelio que surgieron del tejido de cada explanto, y que presentaron crecimiento característico de *Fusarium*, se transfirieron tomando un bloque de medio de aproximadamente 0.5 mm³ con punta de hifa a cajas Petri con SNA. Los cultivos se incubaron a 25° C bajo luz blanca y negra continua por 10 a 15 días para inducir esporulación. Los medios de cultivo utilizados

para realizar aislamientos, caracterización cultural, morfológica y genética se describen en el Anexo II.

2.2.3 Cultivos monospóricos

Para purificar los aislados de *Fusarium* se utilizó la técnica de cultivo monospórico y/o punta de hifa. Se tomaron 3 discos (6 mm de diámetro) de medio SNA con micelio de cultivos activos y se colocaron en un tubo de vidrio con 5 mL de agua destilada estéril agitándose varias veces para obtener una suspensión de conidios. A partir de este tubo (dilución 10^0) se transfirieron 500 μL de manera seriada a tubos con 4.5 mL de agua destilada estéril para preparar diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . Se tomaron 30 μL de la suspensión de cada una de éstas y se colocó sobre la superficie de medio AA al 2% en el centro de cajas Petri 100 x 15 mm. La suspensión fue dispersada con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 25°C en completa oscuridad por 20 horas para inducir la germinación de conidios. Posteriormente se observaron las cajas al microscopio estereoscopio ubicándose conidios germinados aislados, los cuales primeramente de manera individual se obtuvieron cortando un bloque de medio de 1 mm^3 aproximadamente primeramente de manera individual se obtuvieron a cajas con medio SNA. Los cultivos se incubaron como se indicó anteriormente por un periodo de 15 días para inducir abundante esporulación.

2.2.4 Preservación de cultivos monospóricos

Para preservar los aislados monospóricos activos en medio SNA, se agregaron 2 mL de glicerol estéril al 15% sobre el micelio a la caja de cada aislado. La solución de glicerol se pipeteó varias veces sobre el micelio para facilitar el desprendimiento de conidios del micelio. La suspensión de conidios de cada aislado se transfirió a dos viales criogénicos de 2 mL, los cuales fueron almacenados a -70°C en la colección de hongos del Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH.

2.2.5 Caracterización cultural y morfológica

Los aislados se incubaron en los medios PDA, PDA deshidratado SNA y CLA, con luz blanca y negra continua a 25° C. La caracterización morfológica se llevó a cabo de 10 a 14 días después de la inoculación de las cajas. Se hicieron preparaciones para el microscopio compuesto, tomando medio con micelio, para realizar mediciones de 25 macroconidios y 25 microconidios. Y se determinó el número de septos, longitud, ancho, forma y tipo de fiálide (Leslie y Summerell, 2006). La caracterización cultural fue efectuada a los 10 días después de la inoculación de las cajas, determinándose el tipo y color de micelio producido por los aislados en medio PDA (Aoki y Nirenberg 1999, Nirenberg y O'Donnell 1998).

2.2.6 Obtención de micelio para extracción de ADN

A tubos cónicos de 50 mL conteniendo 25 mL de medio mínimo sin agar se le agregaron 3 discos de 6 mm³ de medio CLA con micelio. Los aislados se crecieron de 5 a 8 días en oscuridad (Leslie y Summerell 2006) a una temperatura de 25° C para obtener abundante micelio. El cual se colectó en un embudo con tela Miracloth (Calbiochem) estéril y se lavó 2 veces con 100 mL de agua destilada estéril. El micelio obtenido se depositó en cajas Petri de 100 x 15 mm y sobre éste se colocó una toalla de papel absorbente estéril y fue deshidratado en una incubadora a 29° C durante 6 horas, después se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se almacenó a -20° C.

2.2.7 Extracción de ácidos nucleicos y caracterización genética

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo del micelio molido por medio de un kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit. Promega). El ADN purificado se utilizó en reacciones de PCR con los oligonucleótidos EF-1 y EF-2 (O'Donnell *et al.* 1998b) para amplificar secuencias del gen factor de elongación (EF-1 α). La reacción de PCR se llevó a cabo en microtubos de 0.5 mL en un volumen de 25 μ L. Cada tubo contenía 12.5 μ L de 1X PCR Máster Mix (Promega), 0.125 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (100 μ M) y 7.25 μ L de agua libre de nucleasas (Promega). Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 94° C como paso

inicial de desnaturalización, seguido de 34 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C y 2 minutos a 72° C. Finalizando con una extensión de 5 minutos a 72° C, en un termociclador (Eppendorf). Los fragmentos amplificados de ADN se purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Promega).

El análisis de los fragmentos amplificados de ADN se hizo por electroforesis en geles de agarosa 1.5% con 1X TAE, a 50 volts por 90 minutos. El ADN purificado se envió a la compañía Macrogen Inc. (Seúl, Corea de Sur) para su secuenciación. Las secuencias se ensamblaron y editaron usando MEGA 5.10 (Tamura *et al.* 2011), con la cual se crearon secuencias consenso, las cuales se alinearon a secuencias publicadas en el GenBank utilizando el programa Blast 2.2.19 (Zhang *et al.* 2000; NCBI. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar aquellas con las que presentara un 100% de identidad e identificar las especies de *Fusarium* presentes en los aislados.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Detección de plantas silvestres con síntomas de malformación y obtención de aislados de *Fusarium*

Se detectaron plantas silvestres con tejidos malformados en cinco sitios de Michoacán y en uno de Colima. En algunos casos la malformación estaba presente en los tejidos florales, mientras que en otros fue en tejidos vegetativos. Las especies de plantas en las cuales se detectaron que tenían tejidos malformados son: *Bursera* sp., *Senna occidentalis*, *Swietenia* sp. y *Tabebuia* sp., además de un árbol de identidad desconocida (Cuadro 3). El cual fue destruido poco después de haberse tomado las muestras, por lo que no se pudo hacer un segundo muestreo.

Cuadro 3. Especies de *Fusarium* aisladas de tejidos malformados de plantas de mango y silvestres en Colima y Michoacán.

Especie	Aislado	Hospedante	Localidad	Malformación
<i>F. lactis</i>	COLMW-6	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-8	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-9	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-10	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-11	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-12	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-13	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	COLMW-14	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-5a	Árbol*	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-5b	Árbol	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-5c	Árbol	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	COLMW-7	<i>Swietenia</i> sp.	Tecomán, Col.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-15a	<i>Bursera</i> sp.	Huetamo, Mich	Floral
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-15b	<i>Bursera</i> sp.	Huetamo, Mich	Floral
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-15c	<i>Bursera</i> sp.	Huetamo, Mich	Floral
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-16a	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-16b	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-16c	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-16d	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-17a	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-17b	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-17c	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-18a	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. pseudocircinatum</i>	MICMW-18c	<i>Tabebuia</i> sp.	Apatzingán, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-1a	<i>Swietenia</i> sp.	La Huacana, Mich.	Vegetativa

<i>F. mexicanum</i>	MICMW-1b	<i>Swietenia</i> sp.	La Huacana, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-1c	<i>Swietenia</i> sp.	La Huacana, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMM-2	<i>Mangiferae indica</i>	La Huacana, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-3a	<i>Swietenia</i> sp.	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-3b	<i>Swietenia</i> sp.	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-3c	<i>Swietenia</i> sp.	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMM-4	<i>Mangiferae indica</i>	Nuevo Urecho, Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-19a	<i>Senna occidentalis</i>	Buena Vista T., Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-19b	<i>Senna occidentalis</i>	Buena Vista T., Mich.	Vegetativa
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-20a	<i>Senna occidentalis</i>	Buena Vista T., Mich.	Floral
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-20b	<i>Senna occidentalis</i>	Buena Vista T., Mich.	Floral
<i>F. mexicanum</i>	MICMW-20c	<i>Senna occidentalis</i>	Buena Vista T., Mich.	Floral
<i>F. mexicanum</i>	MICMM-21	<i>Mangiferae indica</i> .	Buena Vista T., Mich.	Vegetativa
<i>F. lactis</i>	MICMW-22a	<i>Senna occidentalis</i>	La Huacana, Mich.	Floral
<i>Fusarium</i>	MICMW-22b	<i>Senna occidentalis</i>	La Huacana, Mich.	Floral
<i>Fusarium</i>	MICMW-22c	<i>Senna occidentalis</i>	La Huacana, Mich.	Floral

- *Árbol no identificado.

***Swietenia* sp** (“Cóbano”, Meliaceae). Árboles maduros de 10 a 30 metros de altura fueron detectados con tejidos malformados en tres localidades; una en Colima y dos en Michoacán. Los síntomas de la malformación ocurren en los brotes vegetativos laterales de las ramas y tallo principal. Los brotes afectados producen abundantes hojas pequeñas y delgadas, las cuales posteriormente se tornan de color café a café oscuro cuando el tejido muere. Los tejidos malformados forman engrosamientos cubiertos por la corteza, similares a las agallas, las cuales se necrosan posteriormente. Las malformaciones o agallas no se desprenden de las ramas del árbol, sino que permanecen adheridas a éste indefinidamente. Al hacer cortes transversales de la agalla se observa tejido activo en el centro de la misma. Los aislamientos se llevaron a cabo a partir de este tejido vivo.

En una área urbana de la ciudad de Tecomán, Colima, se detectaron árboles de *Swietenia* sp. con síntomas de malformación vegetativa (Fig. 5). La incidencia de árboles enfermos fue del 50% (50/100; árboles con malformación/ árboles sanos). Se colectaron tres muestras de tres árboles con síntomas obteniéndose en total nueve aislados de *F. lactis* (Cuadro 3).



Figura 5. *Swietenia* sp. Síntomas de malformación vegetativa.

También se encontró una planta de *Swietenia* sp. con síntomas similares a los observados en Tecomán, en una huerta comercial de mango en la localidad de La Huacana, Michoacán. De esta planta se tomó una muestra con síntomas de malformación vegetativa, de la cual se obtuvieron tres aislados de *F. mexicanum*. También en la misma huerta se colectó una muestra de tejido malformado de un árbol de mango de donde se obtuvo un aislado de la misma especie de hongo (Cuadro 3).

Otros tres árboles de *Swietenia* sp. con síntomas de malformación vegetativa se descubrieron en una huerta de mango en Nuevo Urecho, Michoacán. En uno de ellos se tomó una muestra, de la cual se generaron tres aislados de *F. mexicanum*.

Además, en la misma huerta se colectó una muestra de tejido malformado de un árbol de mango de la cual se obtuvo un aislado del mismo patógeno (Cuadro 3).

Árbol de identidad desconocida. Un árbol no identificado y que presentaba síntomas de malformación vegetativa se ubicó en una huerta de la localidad de Nuevo Urecho, Michoacán. De ese árbol se tomó una muestra vegetativa, de la cual se obtuvieron tres aislados de *F. pseudocircinatum* (Cuadro 3). Los síntomas que se observaron fueron agallas o engrosamientos del tejido vegetativo en las ramas (Fig. 6).



Figura 6. Árbol de identidad desconocida. Síntomas de malformación en las ramas.

Bursera sp. (Burseraceae). En un área urbana de la localidad de Huetamo, Michoacán se ubicó un árbol con síntomas de malformación floral colectándose del mismo una muestra vegetativa, de la cual se obtuvieron tres aislados de *F. pseudocircinatum* (Cuadro 3). Las inflorescencias afectadas presentan los ejes primarios y secundarios muy ramificados, engrosados y acortados (Fig. 7).



Figura 7. *Bursera* sp. Síntomas de malformación floral.

***Tabebuia* sp.** (Nombre común, Cinco Hojas; Bignoniaceae). En un área urbana de la localidad de Apatzingán, Michoacán se ubicaron árboles de *Tabebuia* sp. con síntomas de malformación vegetativa (Fig. 8). En tres de estos árboles se colectaron tres muestras, de las cuales se obtuvieron nueve aislados de *F. pseudocircinatum* (Cuadro 3).

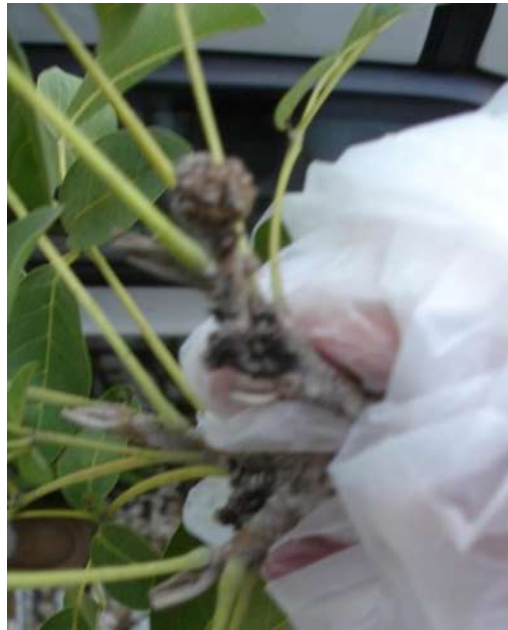


Figura 8. *Tabebuia* sp. Síntomas de malformación vegetativa con engrosamiento de los brotes apicales.

Senna occidentalis (Fabaceae). Plantas de *Senna occidentalis* que presentaban síntomas de malformación se detectaron en dos localidades. Un sitio se ubicó en una huerta comercial de mango en Buena Vista Tomatlán, Michoacán. En donde se colectaron muestras de una planta con síntomas de malformación floral y vegetativa. En el laboratorio se obtuvieron dos aislados de *F. mexicanum* de la malformación vegetativa y tres aislados del mismo hongo a partir de la malformación floral. Además, se colectó una muestra de tejido malformado de mango, obteniéndose también un aislado de *F. mexicanum* (Cuadro 3). El otro sitio se ubicó en una huerta comercial de mango en la localidad de La Huacana, Michoacán. Se colectaron tres muestras de una planta con síntomas de malformación floral, de las cuales se obtuvieron tres aislados de *Fusarium*, siendo uno de ellos de la especie *F. lactis* (Cuadro 3). Los síntomas de la malformación vegetativa en esta planta se caracterizan por un engrosamiento que ocurre en el tallo, entrenudos cortos, hojas pequeñas y deformadas (Fig. 9).



Figura 9. *Senna occidentalis*. Malformación vegetativa.

Se obtuvieron 41 aislados de *Fusarium* de todas las muestras colectadas. De éstos 9 fueron de *F. lactis*, 16 de *F. pseudocircinatum*, 14 de *F. mexicanum* y dos aislados del mismo hongo de especie no determinada (Cuadro 3). Los aislados se purificaron por medio de cultivos monospóricos y/o punta de hifa y se almacenaron en la Colección Micológica del Laboratorio de Patología Vegetal, como suspensiones en glicerol diluido y agua, a -70°C y 4°C , respectivamente.

2.3.2 Identificación de los aislados mediante técnicas moleculares

La identificación de las especies de *Fusarium* utilizando caracteres culturales y morfológicos es problemática debido a la plasticidad que ocurre al cultivar este hongo en medios de cultivo (O'Donnell *et al.* 1998a; Leslie y Summerell, 2006). Los aislados de *Fusarium* resultantes de las colectas se identificaron por medio del siguiente procedimiento. ADN genómico de cada aislado se amplificó usando oligonucleótidos específicos del gen factor de elongación de la traducción (TEF-1 α). Se obtuvieron las

secuencias consenso de los fragmentos amplificados, las cuales se utilizaron en el programa Blast (NCBI) para compararlas con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en el Genbank.

Las especies de *Fusarium* identificadas se muestran en el Cuadro 3. Se identificaron tres especies de *Fusarium* asociadas con los tejidos malformados colectados: *Fusarium lactis*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*.

F. lactis se detectó asociado a tejidos malformados de *Swietenia* sp en Tecomán, Colima, y en *Senna occidentalis* en la Huacana, Michoacán.

F. mexicanum resultó estar asociado a tejidos malformados de *S. occidentalis* y mango en Buenavista, Michoacán; además también se encontró en *Swietenia* sp. y mango en La Huacana, Michoacán, así como en Nuevo Urecho, Michoacán.

F. pseudocircinatum fue identificado en cuatro hospedantes: árbol de identidad desconocida en Nuevo Urecho, Michoacán; en *Bursera* sp. en Huetamo, Michoacán; en *Tabebuia* sp. en Apatzingán, Michoacán; y en *Swietenia* sp. en Tecoman, Colima.

En dos casos se detectó coinfección por dos especies de *Fusarium* en el mismo hospedante. En el primero de ellos, en las muestras de *S. occidentalis* colectadas en La Huacana, Michoacán, se identificaron las especies de *F. lactis* y *F. mexicanum* asociadas al tejido malformado de esta planta. En el segundo caso, en las muestras de *Swietenia* sp colectadas en Tecomán, Colima, se encontraron las especies de *F. lactis* y *F. pseudopcircinatum* asociadas al mismos tejido de este hospedante.

La comparación de las secuencias del gen factor de elongación de la traducción ADN de los aislados se describe a continuación. Los aislados que se identificaron como *F. lactis* presentaron 99% de similitud con secuencias de diversas cepas de esta especie depositadas en GenBank (Anexos VIII y IX). Los aislados que

se obtuvieron de tejidos malformados de malezas, plantas arbustivas y árboles de mango, y cuya identidad resultó ser *F. mexicanum*, tuvieron una similitud del 100% con secuencias de cepas de tal especie descritas previamente (Otero-Colina *et al.* 2010) (Anexos XII y XIII). Los aislados que resultaron ser *F. pseudocircinatum* presentaron 99 a 100% de similitud con diversas cepas de la misma especie, algunas de estas cepas han sido reportadas asociadas a tejidos de mango con malformación vegetativa en Guerrero, México, y con malformación floral en Campeche, México (Otero-Colina *et al.* 2010) (Anexos X y XI).

2.3.3 Caracterización cultural y morfológica de aislados de *Fusarium* obtenidos de malezas y plantas arbustivas silvestres.

A continuación se describen las características culturales y morfológicas de las tres especies de *Fusarium* detectadas en los tejidos malformados de malezas y plantas arbustivas silvestres.

***Fusarium lactis* Pirota y Riboni.** En medio PDA el micelio aéreo fue escaso, el color varió de blanco, crema, amarillo a salmón claro; en tanto que en PDA deshidratado el color del micelio varió de rosa pálido a salmón claro. Mientras que en el reverso de la placa en PDA la pigmentación fue de amarilla claro a salmón claro, y en PDA deshidratado tuvo un color salmón.

Todos los aislados de *F. lactis* presentaron microconidios, los cuales en medio SNA se originaban en falsas cabezas, en mono y polifiálides. Eran de forma oval a obovoide, la mayoría sin septos y solamente un aislado produjo algunos microconidios con un septo. Las medidas de los microconidios de longitud por ancho tuvieron la siguiente variación: 5-17.5 x 2.5-5 μm ; con promedios de 8.98 x 2.78 μm . En algunos aislados no se observaron macroconidios, mientras que en otros fueron escasos. Tales estructuras fueron de forma delgada, casi rectos a ligeramente curvos, generalmente con tres y ocasionalmente cuatro septos. Las medidas de los macroconidios de longitud por ancho, variaron de 27.5-80 x 2.5-5 μm ; y el promedio fue 41.3 x 3.35 μm . Las mediciones morfológicas se presentan en el Anexo VII.

***Fusarium pseudocircinatum* O'Donnell & Nirenberg.** En medio PDA el micelio aéreo fue abundante en algunos aislados de esta especie pero escaso en otros. El color del micelio fue variable de color blanco, café claro, rosa, violeta claro a violeta oscuro. Mientras que el color de la pigmentación en el reverso de la placa fue desde blanco, café claro, crema, rosa, violeta claro a violeta oscuro. En medio PDA deshidratado el color del micelio también tuvo variaciones de amarillo claro, blanco a rojo obscuro. Mientras que en el reverso el color de la pigmentación fluctuó de amarillo claro, naranja claro a rojo obscuro.

Todos los aislados de *P. pseudocircinatum* presentaron microconidios. Algunos de los aislados produjeron abundantes microconidios mientras que en otros fueron escasos. Estas estructuras reproductivas en medio SNA se originaron en falsas cabezas, en mono y polifiálides, mayormente producidas en monofiálides cortas. Presentaron forma oval a ovoide, sin septos o con sólo uno. Las medidas de los microconidios de longitud por ancho tuvieron la siguiente variación 7.5-20 x 2.5-5 µm; con promedios de 11.22 x 2.97 µm. En algunos aislados del hongo no se observaron macroconidios. En los aislados que sí se produjeron éstos fueron delgados, ligeramente rectos, con una célula apical encorvada formando un pico y una célula basal en forma de pie. Se originaban en monofiálides y plofiálides, con tres a seis septos. Las medidas de los macroconidios (longitud por ancho), variaron de 27.5-90 x 2.5-12.5 µm; y promedios de 48.23 x 3.75 µm.

***Fusarium mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz and O'Donnell, sp. nov.** En medio PDA el micelio aéreo fue abundante de *F. mexicanum*. El color de su micelio varió de blanco, rosa claro a violeta. En tanto que en PDA deshidratado éste fue de color blanco a violeta. En medio PDA la pigmentación fluctuó de amarillo claro a violeta obscuro; mientras que en PDA deshidratado el color presentó una variación de amarillo claro, púrpura, violeta obscuro a salmón.

Todos los aislados de *F. mexicanum* produjeron microconidios. Los cuales en medio SNA se originaron en falsas cabezas, en monofiálides y polifiálides. La mayoría presentó forma oval; mientras que algunos tenían forma ariñonada. Además se observaron algunos sin septos y otros con un septo. Las mediciones de los microconidios para longitud por ancho mostraron variación de 7.5-18.75 x 2.5-5 μm ; con promedios de 11.49 x 3.07 μm . Algunos aislados del hongo produjeron abundantes macroconidios; mientras que en dos aislados no se observaron. Los macroconidios tenían la forma típica de canoa de *Fusarium*; éstos fueron curvados dorsiventralmente y más anchos en la parte media, con una célula apical acuminada formando un pico angosto y una célula basal en forma de pie. Se originaban en monofiálides, generalmente con tres septos y algunos macroconidios presentaban de cuatro o seis septos. Las mediciones de los macroconidios (longitud por ancho) variaron de 27.5-70 x 2.5-5 μm ; con promedios de 42.42 x 4.07 μm .

2.4 DISCUSIÓN

En este estudio se detectaron diversas plantas silvestres en los estados de Colima y Michoacán con síntomas de malformación floral y/o vegetativa y agallas. Las plantas silvestres incluyeron una maleza (*S. occidentalis*) y cuatro árboles (un árbol de identidad desconocida, *Bursera* sp., *Tabebuia* sp. y *Swietenia* sp.). También se obtuvieron 41 aislados de hongos de los tejidos malformados, los cuales mostraron características culturales y morfológicas típicas del género *Fusarium*. Los aislados fueron identificados por medio del análisis Blast (NCBI), mediante el cual se comparó la similitud de secuencias del gen nuclear factor de elongación de los aislados obtenidos con secuencias previamente depositadas en el GenBank. Los aislados se agruparon en tres especies: *F. lactis*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*.

Las tres especies de *Fusarium* detectadas en este estudio producen microconidios con características morfológicas típicas del complejo de especies del teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Leslie y Summerell 2006). Las especies del hongo descritas como causantes de la malformación del mango en el ámbito mundial, también se encuentran dentro de este complejo (Marasas *et al.* 2006). De las especies detectadas en este estudio, solamente en *F. mexicanum* ha demostrado tener la capacidad para causar malformación del mango (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Otero-Colina *et al.* 2010). En tanto que *F. pseudocircinatum* ha sido reportado asociado a tejidos malformados de mango en muestras de los estados de Campeche y Guerrero (Otero-Colina *et al.* 2010).

La presencia de *F. lactis* en México no ha sido reportada previamente. Esta especie se ha consiguando causando pudrición interna del pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) en Corea, en los Países Bajos y Canadá (Choi *et al.* 2011; Poucke *et al.* 2012). Además, ha sido detectada ocasionando pudrición interna en higo (*Ficus carica*) en California, EUA (Leslie y Summerell, 2006).

F. pseudocircinatum en este estudio fue aislado de plantas de *Swietenia* sp., *Bursera* sp., *Tabebuia* sp. y de un árbol de identidad desconocida. Como se mencionó anteriormente, este patógeno fue asociado previamente a la malformación vegetativa en mango cultivar Haden en Guerrero y a la malformación floral en el cultivar Tommy Atkins en Campeche (Otero-Colina *et al.* 2010). Además de que también se ha reportado causando una enfermedad de postcosecha en banana (Tarnowski *et al.* 2010). Este hongo tiene una distribución pantropical y ha sido colectado en una variedad de substratos en diferentes países pero poco se sabe sobre su biología o ecología (Leslie y Summerell 2006).

F. mexicanum fue detectado en este trabajo en plantas de *Swietenia* sp., *S. occidentalis* y mango. Es interesante señalar que el análisis Blast mostró que las cepas de este hongo obtenidas de estas plantas, presentaron un 100% de similitud con cepas también del mismo patógeno analizadas previamente (Betancourt-Resendes 2010; Otero-Colina *et al.* 2010), las cuales fueron aisladas de tejidos malformados de mango en Jalisco y Michoacán.

Los resultados del presente estudio indican que *F. lactis*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* tienen una gama de hospedantes que se extiende a plantas de diversas familias botánicas. Este hallazgo es más relevante para *F. mexicanum*, ya que solamente ha sido reportado en mango (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008; Otero-Colina *et al.* 2010). Aun cuando hace falta llevar a cabo pruebas de patogenicidad con los aislados obtenidos de este hongo, el hecho de que se le encontró asociado con dos especies de plantas comunes en las áreas de producción de mango en Michoacán, sugiere que es un patógeno endémico en la región. Debido a que *F. mexicanum* no ha sido detectado en áreas productoras de mango que presenten malformación en el ámbito mundial, excepto en México, la pregunta que surge en este caso es si esta especie se encontraba originalmente infectando plantas de *Swietenia* sp y *S. occidentalis* antes de que existiera el cultivo de mango en México. Una situación similar se ha sugerido para *F. sterilihyphosum*, patógeno causante de la malformación del mango en África del Sur y Brasil. Estudios filogenéticos han

mostrado que la última especie pertenece al clado Americano, por lo que se considera que su origen estaría en alguna planta nativa de Brasil, a pesar de que inicialmente fue descrito causando malformación del mango en África del Sur (Britz *et al.* 2002; O'Donnell *et al.* 2000; Steenkamp *et al.* 2000).

Un hallazgo importante de este trabajo es el haber encontrado a *S. occidentalis* como hospedante de *F. mexicanum*. Esta herbácea podría ser utilizada como planta modelo para realizar pruebas de patogenicidad. Sin embargo, como se mencionó en el párrafo anterior, aun cuando los aislados de *F. mexicanum* asociados con *S. occidentalis* son idénticos en las secuencias del gen factor de elongación a cepas patogénicas del mismo hongo obtenidas de mango en Michoacán. Aún falta realizar pruebas de patogenicidad para confirmar si los aislados de *F. mexicanum* hechos a partir de *S. occidentalis* son capaces de causar malformación en plantas de mango.

La presencia de plantas silvestres que actúan como hospedantes de cepas de *Fusarium* causantes de la malformación del mango es importante desde el punto de vista ecológico y epidemiológico de esta enfermedad. Las malezas y plantas arbustivas que son reservorios de patógenos, generalmente tiene un papel importante en la diseminación y supervivencia de los mismos. Estas plantas podrían estar funcionando como fuentes de inóculo de *Fusarium* hacia huertas de mango. La presencia de malezas y plantas arbustivas como hospedantes naturales de *F. mexicanum* indican la necesidad de detectar su presencia en huertos comerciales de mango y eliminarlas como medida para reducir la incidencia de la malformación en campo.

En el caso de *F. decemcellulare* Brick [(= *Calonectria rigidiuscula* (Berk & Br.)Sacc)] causante de la agalla en cacao y mango (Ploetz y Freeman, 2009), se ha reportado la presencia de este hongo en plantas silvestres asociado a tejidos con agallamiento y/o malformación (Bastos y Santos 2001). En Brasil se detectó causando malformación de inflorescencias en limón amarillo (*Averrhoa bilimbi*,

Averrhoaceae). Los síntomas se presentan en tallo y ramas y se caracterizan por la producción excesiva de flores en las inflorescencias e hinchamientos del raquis floral. En tanto que las flores y frutos jóvenes caen prematuramente. Según Bastos y Santos (2001) también se ha encontrado a este patógeno en Brasil en café (*Coffea arabica* L., Rubiaceae), laurel blanco [*Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken, Boraginaceae], cedro (*Cedrela odorata* L., Meliaceae) y mango. *F. decemcellulare* también ha sido encontrado en Brasil causando la enfermedad agalla del tronco en guaraná (*Paullinia cupana* Ducke, Sapindaceae). Este problema es poco frecuente en las plantaciones de ese cultivo; sin embargo, puede causar la muerte de la planta (Trindade y Poltronieri, 1997). Por otra parte, en la India, la enfermedad agalla fue reportada para el árbol frutal *Zizyphus mauritiana* Willd. (= *Z. jujuba* Lamk., Rhamnaceae) (Singh y Singh, 1978). La fase sexual de *F. decemcellulare*, *Aalonectria rigidiuscula*, ha sido reportado señalada estar asociada con la formación de agallas en cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ghana. La enfermedad no es sistémica y el patógeno causó agallas solo cuando fue inoculado en los brotes (Brunt y Wharton, 1962).

Los resultados de esta investigación abren varias líneas de futuros trabajos. Por una parte, sería importante determinar la diversidad poblacional de los aislados fungosos detectados en las plantas silvestres, y comparar esa diversidad con cepas obtenidas en otras partes del mundo. Para esto, se requerirá la amplificación de genes nucleares y ribosomales adicionales al gen factor de elongación, para un mejor análisis filogenético de estas especies de *Fusarium*. Otras secuencias de genes que se han estudiado en poblaciones de *Fusarium* son: β -tubulina (Steenkamp *et al.* 2000), calmodulina (Carbone y Kohn, 1999) y RNA polimerasa II (*RPB2* y *RPB1*) (Matheny, 2005; O'Donnell *et al.* 2007). Los resultados de la caracterización cultural y morfológica indican que los aislados de *Fusarium* estudiados en este trabajo, presentan diferencias con lo reportado previamente para otras cepas de estas especies (Leslie y Summerell, 2006).

Es importante también realizar pruebas de patogenicidad e investigar los metabolitos secundarios producidos por los taxones involucrados en la malformación del mango y de las plantas silvestres aquí reportadas con malformación o agallas para determinar si producen micotoxinas. Finalmente, se requiere efectuar un muestreo más amplio para detectar otras plantas que presenten síntomas de malformación e identificar los patógenos que la causan.

2.5 CONCLUSIONES

Se identificaron tres especies de *Fusarium* que causan malformación en especies de malezas y plantas arbustivas silvestres: *F. lactis*, *F. pseudocircinatum* y *F. mexicanum*. De estas especies la última también ocasiona malformación en mango. Por lo que las especies vegetales en las que se detectó pueden ser reservorios de este patógeno. Lo cual pudiera tener implicaciones epidemiológicas en el desarrollo la enfermedad y se debiera considerar en el manejo y control de la misma.

2.6 LITERATURA CITADA

- Aoki, T. y Nirenberg, H. 1999. ***Fusarium globosum* from subtropical Japan and the effect of different light conditions on its conidiogenesis.** *Mycoscience* 40: 1-9.
- Bastos, C. N. y Santos, A. O. 2001. **Superbrotamiento de inflorescências do limão-de-caieira causado por *Fusarium decemcellulare*.** *Fitopatologia Brasileira*. 26: 222.
- Betancourt-Resendes, I. 2010. **Compatibilidad vegetativa de *Fusarium mexicanum* agente causal de la malformación de mango en Jalisco.** Tesis Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 73 pp.
- Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., y Wingfield, M. J. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation.** *Mycologia* 94: 722-730.
- Brunt A. A. F. y Wharton, A. L. 1962. **Etiology of a gall disease of cocoa in Ghana caused by *Calonectria rigidiscula* (Berk. y Br.) Sacc.** *Annals of Applied Biology*. 50:283-289.
- Carbone, I. y Kohn L. M. 1999. **A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes.** *Mycologia* 91: 553-556.
- Choi, H. W., Hong, S. K., Kim, W. G., y Lee, Y. K. 2011. **First report of internal fruit rot of sweet pepper in Korea caused by *Fusarium lactis*.** *Plant Disease* 11: 1476.
- Crespo, M., Cazorla, F. M., Hermoso, J. M., Guirado, E., Maymon, M., Toré, J. A., Freeman, S. y de Vicente, A. 2012. **First report of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* in Spain.** *Plant Disease* 96: 286.
- Freeman S, Maimon, M., y Pinkas, Y. 1999. **Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease.** *Phytopathology* 89: 456-461.
- Kumar, J., Singh, U. S., y Beniwal, S. P. S. 1993. **Mango malformation: one hundred years of research.** *Annual Review of Phytopathology* 31: 217-232.
- Kvas, M., Steenkamp, E. T., Al Adawi, A. O., Deadman, M. L., Al Jahwari, A. A., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Ploetz, R. C. y Wingfield, M. J. 2008.

- Fusarium mangiferae* associated with mango malformation in the Sultanate of Oman.** *European Journal of Plant Pathology* 121: 195-199.
- Leslie J. F. y Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Blackwell Publishing. U.S.A-Oxford-Australia. 388 pp.
- Lima, C. S., Pfennig, L. H., Costa, S. S., Campos, M. A., y 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., Pfennig, 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., y Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.** *Phytopathology* 96: 667–672.
- Matheny P. B. 2005. **Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 1-20.
- Nirenberg, H. I. y O'Donnell, K. 1998. **New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex.** *Mycologia* 90: 434-458.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Casper, H. H. 1998a. **Molecular, phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*.** *Fungal Genetics and Biology* 23: 57-67.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C. Cigelnik, E., y Ploetz, R. C. 1998b. **Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T. y Cigelnik, E. 2000. **A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species.** *Mycoscience* 4: 61-78.

- O'Donnell, K., Sarver, B. A. J., Brandt, M., Chang, D. C., Noble-Wang, J., Park, B. J., Sutton, D. A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A., Geiser, D. M., y Ward, T. J. 2007. **Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U. S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006.** *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2235-2248.
- Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T., O'Donnell, K., y Freeman, S. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov.** *Phytopathology* 11: 1176-1184.
- Ploetz, R. C. 1994. **Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation.** *Canadian Journal of Botany* 72: 7-9.
- Ploetz R. C. 2003. **Diseases of Mango.** In: Ploetz RC (Ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops. CABI Publishing.
- Ploetz R. C. y Freeman, S. 2009. **Foliar, Floral and Soilborne Diseases.** En: Litz RE (ed.). The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. CAB International.
- Ploetz, R., Zheng, Q. I., Vazquez, A., y Abdel Sattar, M. A. 2002. **Current status and impact of mango malformation in Egypt.** *International Journal of Pest Management* 48: 279-285.
- Poucke, K. V., Monbaliu, S., Munaut, F., Heungens, K., De Saeger, S., y Hove, F. V. 2012. **Genetic diversity and mycotoxin production of *Fusarium lactis* species complex isolates from sweet pepper.** *International Journal of Food Microbiology* 153: 28-37.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C, y 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.
- Singh U. P. y Singh, H. B. 1978. **Occurrence of *Fusarium decemcellulare* on living galls of *Zizyphus mauritiana* in India.** *Mycologia* 70: 1126.

- Sinniah, G. D., Adikaram, N. K. B., Vithanage, I. S. K., Abayasekara, C. L., Maymon, M., y Freeman, S. 2013. **First report of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* in Sri Lanka.** *Plant Disease* 97: 427.
- 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.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. 2011. **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods software version 5.10.** *Molecular Biology Evolution* 28: 2731–2739.
- Tarnowski, T. L., Pérez-Martínez, J. M., y Ploetz, R. C. 2010. **Fuzzy pedicel: A new postharvest disease of banana.** *Plant Disease* 94:621-627.
- Trindade, D. R. y L. S. Poltronieri, L. S. 1997. **Doenças do Guarana. Capítulo 43.** Pp. 430-431. En: Manual de Fitopatología. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo, J.A.M. Rezende (Editores). Editora Agronomica Ceres Ltda. Sao Paulo, Brasil.
- 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.

DISCUSIÓN GENERAL

La malformación es un problema importante en la industria del mango en muchas áreas del mundo donde se cultiva este frutal. Esta enfermedad llega a ser un factor limitante para el establecimiento de huertas económicamente viables (Kumar y Beniwal 1992). Se desconocen muchos aspectos sobre este problema tales como el origen y modos de diseminación de las especies de *Fusarium* que lo causan. En este trabajo se buscó determinar el posible origen de las especies de *Fusarium* que ocasionan la malformación del mango en la región centro occidente de México. Así, se reportan en este estudio varios hallazgos interesantes. Por una parte, se detectó la presencia de plantas de mango con síntomas de malformación en viveros comerciales de Michoacán. Además, se determinó la existencia de plantas silvestres en los alrededores de huertas comerciales de mango o en áreas cercanas a ellas, con síntomas de agallas y/o malformación.

Se identificó a *F. mexicanum* asociado a los tejidos en plantas de mango que mostraron síntomas de malformación vegetativa o floral. Este hongo ha sido descrito causando el mismo problema en mango en tres estados: Guerrero, Michoacán y Morelos (Otero-Colina *et al.* 2010). La presencia de plantas de mango con los síntomas mencionados en diez viveros comerciales del estado de Michoacán, sugiere que éste es uno de los modos de dispersión del patógeno a huertos comerciales de la región. Situaciones similares se han observado en otros países productores de mango (Ploetz *et al.* 2002). Esto es debido a que el viverista remueve el tejido malformado y posteriormente vende la planta infectada, pero sin síntomas aparentes, al productor de mango (G. Rodríguez Alvarado, comunicación personal). De este modo, la falta de regulación fitosanitaria, y el comercio informal e introducción de plántulas de mango provenientes de otros estados facilita la diseminación de la enfermedad de un estado a otro en el país.

En este estudio se detectó la presencia de malformación vegetativa, floral y agallas, en varias plantas silvestres: *Swietenia* sp., *S. occidentalis*, *Bursera* sp.,

Tabebuia sp, y un árbol de identidad desconocida, en varias localidades de los estados de Colima y Michoacán. Con la excepción de los árboles de *Tabebuia* sp. que se encontró en una área urbana de Tecomán, Colima, el resto de las especies silvestres de plantas se localizaron en áreas cercanas a huertos comerciales de mango. Estas plantas podrían actuar como fuentes de inóculo o reservorios naturales de *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*, especies causantes de la malformación del mango. El hallazgo de plantas silvestres que son hospedantes de especies de *Fusarium* que también causan la malformación del mango, sugiere que estos patógenos son endémicos en la región, por lo que el control de la enfermedad podría ser difícil. Existen pocos reportes en la literatura de especies de *Fusarium* asociadas a tejidos malformados de plantas silvestres, malezas y plantas arbustivas. *F. decemcellulare* es la especie más reportada en la literatura, asociada a plantas con malformaciones y agallas (Bastos y Santos 2001; Brunt y Wharton, 1962; Ploetz y Freeman, 2009; Singh y Singh, 1978; Trindade y Poltronieri, 1997). Este patógeno no fue detectado en este estudio.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Al establecer medidas de manejo y control de la malformación del mango en campo, es necesario tomar en cuenta varios aspectos que surgen de este trabajo. Por una parte, se requiere considerar que la producción de plántulas de este frutal no está regulada fitosanitariamente, y que los patógenos que ocasionan la enfermedad podrían estar establecidos en la región de manera endémica. De este modo, se necesita que las autoridades ejerzan un mejor control de los viveros dedicados a la producción de planta de mango. Y que en las prácticas culturales en las huertas de este cultivo, además de la poda y destrucción de los tejidos, se trate de controlar a las malezas y plantas arbustivas que muestren síntomas de malformación vegetativa o floral y/o agallas, para prevenir la diseminación de la enfermedad de estas especies de *Fusarium* en huertos comerciales en las áreas donde se cultiva mango.

LITERATURA COMPLEMENTARIA

- Bastos, C. N. y Santos, A. O. 2001. **Superbrotamiento de inflorescencias de lima-de-caiena causado por *Fusarium decemcellulare***. *Fitopatologia Brasileira* 26: 222.
- Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., y Wingfield, M. J. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation**. *Mycologia* 94: 722-730.
- Brunt A. A. F. y Wharton, A. L. 1962. **Etiology of a gall disease of cocoa in Ghana caused by *Calonectria rigidiscula* (Berk. y Br.) Sacc.** *Annals of Applied Biology* 50:283-289.
- 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.
- FAOSTAT. 2012. Database. Statisticals Production of mango. Datos disponibles en internet. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
- Galán, S. V. 1990. **Los frutales tropicales en los subtropicos I. Aguacate, mango, litchi y longan**. Ed. Mundi Prensa. España. 133 p.
- Gaur V. P. y Chakrabarti, D. K. 2009. **Incidence of malformation in mango (*Mangifera indica*) nurseries in eastern Uttar Pradesh**. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 2: 160-162.
- Gamliel-Atinsky, E., Szejnberg, A., Maymon, M., Shtienberg, D. y Freeman, S. 2009a. **Inoculum availability and conidial dispersal patterns of *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease**. *Phytopathology* 99:160-166.
- Gamliel-Atinsky, E., Szejnberg, A., Maymon, M., Vintal, H., Shtienberg, D., y Freeman, S. 2009b. **Infection dynamics of *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease**. *Phytopathology* 99:775-781.
- Kumar, J. y Beniwal, S. P. S. 1992. **Mango malformation**. In: J. Kumar, H. S. Chaube, U.S. Singh y A. N. Mukhopadhyay (eds.), *Plant Diseases of International Importance. Diseases of Fruit Crops*. Vol. 3. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp.357-393.
- Kumar, J., Singh, U. S., y Beniwal, S. P. S. 1993. **Mango malformation: one hundred years of research**. *Annual Review of Phytopathology* 31: 217-232.

- Lima, C. S., Pfennig, L. H., Costa, S. S., Campos, M. A., y 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 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., y Steenkamp, E. T. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.** *Phytopathology* 96: 667-672.
- Mukherjee, S. K. 1997. **Introduction: Botany and Importance.** Pages 1-19 in: The Mango: Botany, Production and Uses. R. E. Litz, ed. CAB International, Wallingford, UK.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., y 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. P., Maymon, M., Ploetz, R.C., Aoki, T., O'Donnell, K., y 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.
- Parrotta, J. A. 1993. ***Mangifera indica* L. Mango.** SO-ITF-SM-63. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 6 p.
- Ploetz, R. C. 1994. **Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation.** *Canadian Journal of Botany* 72: 7-9.
- Ploetz, R. C. 2003. **Diseases of mango.** p. 327-364. In: Ploetz, R. (Ed.) Diseases of Tropical Fruit Crops. CABI Publishing, Cambridge, USA. 527 p.
- Ploetz, R. C. y Freeman, S. 2009. **Foliar, floral and soilborne diseases.** p. 231-289. In: Litz, R. E. (Ed.) The mango. 2nd Ed. Botany, Production and Uses. CAB International.
- Ploetz, R., Zheng, Q. I., Vazquez, A. y Abdel Sattar, M. A. 2002. **Current status and impact of mango malformation in Egypt.** *International Journal of Pest Management* 48: 279-285.

- Prasad, A., Nirwan, R. S., y Singh, S. 1972. **Mango malformation**. *Acta Horticulturae* 24:229-231.
- Rymbai, H. y Rajesh, A. M. 2011. **Mango malformation: a review**. *Life sciences Leaflets* 22:1079-1095. <http://lifesciencesleaflets.ning.com/> (Accesada en diciembre de 2012)
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Ploetz, R. C., y Valenzuela-Vázquez, M. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, México**. *Plant Pathology* 57:781.
- SIAP-SAGARPA. 2011. Estadística de la producción de mango. Datos disponibles en internet. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventana.php?idLiga=1742&tipo=1>
- Singh U. P. y Singh, H. B. 1978. **Occurrence of *Fusarium decemcellulare* on living galls of *Zizyphus mauritiana* in India**. *Mycologia* 70: 1126.
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., y Marasas, W. F. O. 1999. **Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. By histone gene sequence data**. *Applied Environmental Microbiology* 65:3401-3406.
- Steenkamp, E. T., Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J. 2000. **Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation**. *Molecular Plant Pathology* 1:187-193.
- Trindade, D. R. y L. S. Poltronieri, L. S. 1997. **Doenças do Guarana. Capítulo 43**. Pp. 430-431. En: Manual de Fitopatología. Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas. H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo, J.A.M. Rezende (Editores). Editora Agronomica Ceres Ltda. Sao Paulo, Brasil.
- Youssef, S. A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., Szejnberg, A., Shalaby, A. A., y Freeman, S. 2007. **Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt**. *Plant Pathology* 56:257-263.
- Youssef, S. A., Shalaby, A. A., Szejnberg, A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., y Freeman, S. 2009. **Malformation presence in mango seedling trees cultivated within infected Egyptian orchards**. *Acta Horticulturae* 820:479-482.

ANEXOS

Anexo I. Viveros muestreados y en los que se determinó la incidencia de malformación del mango en los estado de Guerrero y Michoacán.

Localidad	No. Vivero	Cultivar	Total Plantas
La Caballada, Apatzingán, Michoacán	I	Kent	150
	I	Criollo	166
Santa Casilda, Gabriel Zamora, Michoacán	II	Criollo	713
	II	Kent	5049
Gabriel Zamora, Michoacán	III	Criollo	836
Santa Ana, Buena Vista T., Michoacán	IV	Criollo	159
Rancho el 25, Buena Vista T., Michoacán	V	Kent	185
	V	Haden	210
	V	Criollo	153
Bahía de Petacalco, La Unión de Isidro Montes de Oca, Guerrero	VI	Criollo	47000
	VI	T. Atkins	8000
	VI	Kent	1500
	VI	Ataulfo	2800
	VI	Haden	5000
Zacatula, La Unión de Isidro Montes de Oca, Guerrero	VII	Ataulfo	2000
	VII	T. Atkins	7000
	VII	Haden	5000
	VII	Kent	10000
	VII	Manila	1000
	VIII	Ataulfo	1600
	VIII	T. Atkins	900

	VIII	Haden	1000
	IX	Haden	3000
	IX	T. Atkins	3000
	IX	Ataulfo	3000
	IX	Criollo	15000
	X	Haden	4000
	X	T. Atkins	6000
	X	Ataulfo	1500
	X	Criollo	40000
Bahía de Petacalco, La Unión de Isidro Montes de Oca, Guerrero	XI	Ataulfo	3200
	XI	T. Atkins	1920
	XI	Haden	5000
	XI	Kent	3000
	XI	Irwin	1200
	XI	Superataulfo	1000
Coalcomán de Vázquez Pallares, Michoacán	XII	Criollo	3
	XII	Haden	15
	XII	T. Atkins	4
	XII	Kent	2
La Parota, Buena Vista T., Michoacán	XIII	Criollo	61
Apatzingán, Michoacán	XIV	Criollo	10
	XV	Criollo	1361
Uspero, Parácuaro, Michoacán	XVI	Criollo	438
Santa Casilda, Gabriel Zamora,	XVII	Criollo	30848
	XVII	T. Atkins	100

Michoacán	XVII	Kent	98
	XVIII	Haden	491
	XVIII	Criollo	693
	XVIII	T. Atkins	223
	XVIII	Ataulfo	89
	XVIII	Keitt	67

Anexo II. Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon en volúmenes de 250 mL de la siguiente manera: los ingredientes se pesaron y colocaron en frascos de 500 mL, también se agregaron 250 mL de agua destilada; enseguida se disolvieron en horno de microondas, y esterilizaron en una autoclave a 121°C y 15 libras (lb) 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, se vació en cajas Petri 100 x 15 mm o 60 x 15 mm, en una cámara de flujo laminar estéril. Las cajas Petri con medio se almacenaron en bolsas de plástico cerradas a 25°C hasta su uso.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) diluido. 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 sartén con 250 mL de agua destilada para hervirse a fuego lento hasta su cocción. Consecutivamente, la infusión obtenida se filtró con 2 capas de gasa en embudo y se aforó con agua destilada hasta obtener un volumen final de 250 mL. Éste se vació en un frasco de vidrio de 500 mL, donde se agregaron también 2.5 g de dextrosa y 5 g de agar bacteriológico. Antes de vaciar el medio en cajas Petri se le adicionaron 500 µL de cada antibiótico (estreptomina y penicilina) con el propósito de inhibir el crecimiento de contaminantes bacterianos.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA). En este caso 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 sartén con 250 mL de agua destilada para hervirse 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. Éste se vació en un frasco de vidrio de 500 mL, además se agregaron 5 g de dextrosa y 5 g de agar.

Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) Deshidratado. Este medio se preparó con 9.75 g de agar dextrosa y papa (BD Bioxon) y 250 mL de agua destilada estéril, que se colocaron en un frasco de 500 mL.

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 Petri 60 x 15 mm, en el centro de cada una de ellas se colocaron rectángulos de papel filtro Whatman estéril de aproximadamente 1 cm².

Agar agua 2% (AA). En 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 enseguida esterilizarse en la autoclave.

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

Medio mínimo (MM). Se preparó de acuerdo al protocolo descrito por Leslie y Summerell (2006) en un volumen de 250 mL, el cual contenía 0.05 mL de solución de elementos, agregando 25 mL de medio mínimo a tubos cónicos de 50 mL.

Anexo III. Características morfológicas de macroconidios y microconidios de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de mango en condiciones de vivero.

Código	Macroconidio				Microconidio			
	Longitud media μm	Longitud intervalo μm	Ancho media μm	Ancho intervalo μm	Longitud Media μm	Longitud Intervalo μm	Ancho media μm	Ancho intervalo μm
MICV-6	27.8	25-35	2.65	2.5-3.75	10.2	7.5-15	3.6	2.5-5
MICV-20	39.5	30-50	4.75	3.75-5	10.6	7.5-17.5	3.05	2.5-3.75
MICV-21	45.2	35-55	3.9	3.75-5	9.85	7.5-15	3	2.5-5
MICV-22	NO	NO	NO	NO	10.5	7.5-15	3.75	2.5-5
MICV-23	38.4	32.5-45	3.3	2.5-5	11.5	7.5-17.5	3.2	2.5-5
MICV-24	38.25	32.5-42.5	3.4	2.5-5	11.2	7.5-17.5	3.25	2.5-5
MICV-25	34	28.75-42.5	3.65	2.5-5	11.15	7.5-17.5	3.35	2.5-3.75
MICV-26	35.75	30-45	4.15	2.5-5	11.9	7.5-18.75	2.95	2.5-3.75
MICV-27	41.55	32.5-55	4.3	3.75-5	15.05	10-20	3.25	2.5-3.75
MICV-28	38.35	32.5-45	3.75	2.5-5	11.5	7.5-17.5	3.55	2.5-5
MICV-29	NO	NO	NO	NO	11.15	7.5-17.5	4	2.5-5
MICV-30	36.05	30-42.5	3.8	2.5-5	11.95	7.5-18.75	3.75	2.5-5
MICV-31	37.45	30-42.5	4.1	2.5-5	11.2	7.5-17.5	3.3	2.5-5
MICV-33	31.85	27.5-37.5	4.05	2.5-5	13.1	7.5-18.75	3.45	2.5-5
MICV-39	32.65	27.5-37.5	4.85	3.75-5	10.1	7.5-15	3.7	2.5-5
MICV-40	NO	NO	NO	NO	11.35	7.5-17.5	3.05	2.5-5
MICV-41	35.85	32.5-45	4.8	3.75-5	11.55	7.5-17.5	3.55	2.5-5
MICV-42	37.82	30-42.5	4.45	2.5-5	12.85	7.5-17.5	3.65	2.5-5
MICV-43	53.95	45-65	3.75	2.5-5	13.45	7.5-17.5	3.75	2.5-5
MICV-44	33.75	27.5-37.5	4.6	2.5-5	11.3	7.5-17.5	3.6	2.5-5
MICV-45	38.6	32.5-47.5	3.9	3.75-5	11.8	7.5-16.25	3.8	2.5-5
MICV-46	36.7	30-45	4.75	2.5-5	11.35	7.5-17.5	3.15	2.5-5
MICV-47	34.5	30-42.5	4.3	2.5-5	11.05	7.5-17.5	3.25	2.5-5
MICV-48	33.25	28.75-37.5	4.7	2.5-5	9.9	5-12.5	3.75	2.5-5
MICV-49	36.7	32.5-42.5	3.9	2.5-5	11.9	8.75-15	3.55	2.5-5
MICV-50	40.85	32.5-50	3.75	2.5-5	12.35	7.5-15	3.55	2.5-5
MICV-51	34.4	30-42.5	4.15	2.5-5	11.15	7.5-17.5	3.8	2.5-5
MICV-52	35.3	30-42.5	4.6	3.75-5	12.6	7.5-17.5	4	2.5-5
MICV-53	37.75	32.5-42.5	4.45	2.5-6.25	12.05	10-17.5	4.05	2.5-5
MICV-54	34.1	30-40	4.5	2.5-5	12.45	10-15	4.1	2.5-5
MICV-55	35.9	32.5-45	3.8	2.5-5	12.25	10-16.25	4.3	2.5-5
MICV-56	39.6	35-45	4.45	2.5-5	10.95	8.75-12.5	4.5	3.75-5

MICV-57	41.25	37.5-45	4.15	2.5-5	11	8.75-12.5	4.4	2.5-5
---------	-------	---------	------	-------	----	-----------	-----	-------

NO= No se observó

Anexo IV. Análisis Blast en GenBank utilizando secuencias del aislado MICV-52.

No. Accesoión	Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad
GU737270.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53135	1184	94%	100%
GU737271.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53136	1184	94%	100%
JN176080.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-3	1125	89%	100%
JN176085.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-8	1123	89%	100%
GU737284.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53150	1173	94%	99%
GU737286.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53575	1168	94%	99%
AF160307.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26756	1168	94%	99%
JN176084.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-7	1120	90%	99%
JN176078.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-1	1105	89%	99%

Anexo V. Análisis Blast en GenBank utilizando secuencias del aislado MICV-40.

No. Accesoión	Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad
GU737286.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53575	1157	97%	100%
JN176084.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-7	1110	93%	100%
JN176078.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-1	1095	92%	100%
AF160307.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26756	1148	97%	99%
GU737270.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53135	1142	97%	99%
AF160308.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26757	1142	97%	99%
JN176080.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-3	1085	92%	99%
JN176085.1	<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-8	1083	92%	99%
AF160296.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25346	1139	97%	99%
GU737284.1	<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53150	1131	97%	99%
EU921243.1	<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain FCC 1092	1128	97%	99%
EU921242.1	<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6742	1119	96%	99%
EU921241.1	<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6754	1121	97%	99%

Anexo VI. Alineamiento de secuencias del factor de elongación de aislados MICV-40 y MICV-52.

Identities = 655/658 (99%), Gaps = 0/658 (0%)

```

MICV-52.EF      AAGACTCACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTG 60
MICV-40.EF      -----ACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTG 53
                *****

MICV-52.EF      AGTACAACCTCGACGATGAGCTTATCTGCCATCGTCATCCCGACCAAGATCTGGCGGG 120
MICV-40.EF      AGTACAACCTCGACGATGAGCTTATCTGCCATCGTCATCCCGACCAAGATCTGGCGGG 113
                *****

MICV-52.EF      TATCTCAAAGATAACATGCTGACATCGCTTCACAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCG 180
MICV-40.EF      TATCTCAAAGATAACATGCTGACATCGCTTCATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCG 173
                *****

MICV-52.EF      GTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTTACTTTCCTTCGATC 240
MICV-40.EF      GTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTTACTTTCCTTCGATC 233
                *****

MICV-52.EF      GCGCGTCCTTTGCCCATCGATTCTCCATACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCGCTCAA 300
MICV-40.EF      GCGCGTCCTTTGCCCATCGATTCTCCATACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCGCTCGA 293
                *****

MICV-52.EF      GACCAAAAATTTTGCATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCG 360
MICV-40.EF      GACCAAAAATTTTGCATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCG 353
                *****

MICV-52.EF      AGCGACCGCGTTTCTGCCCTCTCATTTCCACAACCTTCTGAGCGCATCGTCACGTGTTAA 420
MICV-40.EF      AGCGAGCGCGTTTCTGCCCTCTCATTTCCACAACCTTCTGAGCGCATCGTCACGTGTTAA 413
                *****

MICV-52.EF      GCAGTCACTAACCATTTCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA 480
MICV-40.EF      GCAGTCACTAACCATTTCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA 473
                *****

MICV-52.EF      CGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGC 540
MICV-40.EF      CGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGC 533
                *****

MICV-52.EF      TCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCAT 600
MICV-40.EF      TCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCAT 593
                *****

MICV-52.EF      GCCTCGTTCTCCCTTTATTCGACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCATCGTGACT 660
MICV-40.EF      GCCTCGTTCTCCCTTTATTCGACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCATCGTGACT 653
                *****

MICV-52.EF      TCATCAAGAACATGATC 677
MICV-40.EF      TCATC----- 658

```

Anexo VII. Características morfológicas de los aislados de *Fusarium* obtenidos de malezas y plantas arbustivas de los estados de Michoacán y Colima.

Aislado	Macroconidios		Microconidios		Macroconidios		Microconidios	
	Media		Media		Intervalo		Intervalo	
	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm
MICMW-1a	35.25	4.45	12.45	3.4	27.5-42.5	3.75-5	7.5-17.5	2.5-5
MICMW-1b	34.1	3.65	12	3.15	27.5-40	2.5-5	7.5-17.5	2.5-5
MICMW-1c	NO*	NO	11.95	3.15	NO	NO	7.5-17.5	2.5-5
MICMM-2	42.1	4.2	12.7	2.7	32.5-50	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-3a	37.5	3.85	11.5	2.9	30-47.5	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-3b	44.2	3.7	11.6	3.2	32.5-57.5	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-3c	39.45	3.85	10.45	2.95	30-52.5	2.5-5	7.5-16.25	2.5-3.75
MICMM-4	NO	NO	11.3	3.15	NO	NO	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-5a	54.3	3.45	11.9	2.7	42.5-77.5	2.5-3.75	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-5b	55.1	2.85	10.4	2.55	40-70	2.5-3.75	7.5-16.25	2.5-3.75
MICMW-5c	56.6	3.5	11.8	2.95	37.5-82.5	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75
COLMW-6	NO	NO	6.6	2.5	NO	NO	5-10	2.5
COLMW-7	36.7	4.75	11.8	3	30-52.5	3.75-12.5	7.5-17.5	2.5-3.75
COLMW-8	31.7	3.75	10.2	3	27.5-37.5	3.75	7.5-15	2.5-5
COLMW-9	NO	NO	9	2.65	NO	NO	7.5-12.5	2.5-3.75
COLMW-10	53.1	2.9	11.1	3	35-80	2.5-3.75	7.5-17.5	2.5-3.75
COLMW-11	NO	NO	8.9	2.85	NO	NO	7.5-12.5	2.5-3.75
COLMW-12	33.7	3.4	8.6	2.75	27.5-42.5	2.5-5	7.5-12.5	2.5-3.75
COLMW-13	NO	NO	9.4	2.85	NO	NO	7.5-12.5	2.5-3.75
COLMW-14	NO	NO	8.1	2.7	NO	NO	7.5-12.5	2.5-3.75
MICMW-15a	48.2	3.85	11.05	3	40-57.5	3.75-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-15b	NO	NO	9.9	3	NO	NO	7.5-12.5	2.5-3.75
MICMW-15c	36.7	3.75	10.9	2.95	30-47.5	3.75	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-16a	48.9	3.85	11.6	2.95	37.5-67.5	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-16b	42.3	3.55	11.3	2.85	37.5-50	2.5-5	7.5-17.5	2.5-3.75

MICMW-16c	74.4	3.7	15.4	2.8	60-90	2.5-5	10-20	2.5-3.75
MICMW-16d	50.3	3.75	11.1	3	37.5-65	3.75	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-17a	NO	NO	10.3	3.6	NO	NO	7.5-15	2.5-5
MICMW-17b	NO	NO	10.95	3.3	NO	NO	7.5-15	2.5-5
MICMW-17c	37.7	4.1	8.2	2.5	27.5-45	3.75-5	7.5-10	2.5
MICMW-18a	41.5	3.8	10.6	3.2	32.5-60	2.5-5	7.5-15	2.5-3.75
MICMW-18c	44.4	3.9	12.4	3.3	35-57.5	3.75-5	7.5-17.5	2.5-5
MICMW-19a	47.6	3.55	10.6	2.95	35-62.5	2.5-3.75	7.5-15	2.5-3.75
MICMW-19b	48.4	4.3	11.2	3.1	35-55	3.75-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-20a	42.5	4.15	11.1	3.2	35-57.5	3.75-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-20b	52.9	4.5	12.45	3.15	42.5-70	3.75-5	7.5-17.5	2.5-3.75
MICMW-20c	44.5	4	9.9	2.85	35-62.5	2.5-5	7.5-15	2.5-3.75
MICMM-21	40.6	4.65	11.7	3.15	32.5-55	3.75-5	7.5-18.75	2.5-3.75

*NO. No se observaron en las preparaciones.

Anexo VIII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado COLMW-6. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	No. Accesoión
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52692	1195	98%	99%	FR870283.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52697	1195	98%	99%	FR870284.1
<i>Fusarium lactis</i> NRRL 31629	1155	95%	99%	FR870288.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF16	1147	94%	99%	JF411958.1
<i>Fusarium lactis</i> strain NRRL25200	1149	95%	99%	AF160272.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF22	1144	94%	99%	JF411959.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 51854	1140	94%	99%	FR870290.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF09	1136	94%	99%	JF411957.1

<i>Fusarium lactis</i> strain SPF01	1120	93%	99%	JF411956.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52696	1194	99%	99%	FR870286.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52803	1157	98%	98%	FR870287.1

Anexo IX. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-22a. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	No. Accesoión
<i>Fusarium lactis</i> MUC 52696	1221	99%	99%	FR870286.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52692	1203	98%	99%	FR870283.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 52697	1203	98%	99%	FR870284.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF16	1158	94%	99%	JF411958.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF22	1155	95%	99%	JF411959.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF09	1147	94%	99%	JF411957.1
<i>Fusarium lactis</i> NRRL 31629	1151	95%	99%	FR870288.1
<i>Fusarium lactis</i> strain SPF01	1131	93%	99%	JF411956.1
<i>Fusarium lactis</i> strain NRRL25200	1146	95%	99%	AF160272.1
<i>Fusarium lactis</i> MUCL 51854	1136	94%	99%	FR870290.1

Anexo X. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-5a. Máxima identidad de 99% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	No. Acceso
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 53570	1158	94%	99%	GU737398.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	1120	91%	99%	GQ425230.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 53573	1153	94%	99%	GU737399.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL22946	1147	94%	99%	AF160271.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	1083	89%	99%	GU377298.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 25034	1149	99%	97%	JF740710.1

Anexo XI. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-16d. Máxima identidad de 99 a 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	Acceso
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 53570	1190	95%	100%	GU737398.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	1151	92%	100%	GQ425230.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL 53573	1184	95%	99%	GU737399.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i> strain NRRL22946	1179	95%	99%	AF160271.1
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	1114	91%	99%	GU377298.1
<i>Fusarium oxysporum</i> isolate BW-7108	1101	97%	97%	DQ435349.1

Anexo XII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMW-1a. Máxima identidad de 99 al 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	Acceso
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53135	1184	94%	100%	GU737270.1
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53136	1184	94%	100%	GU737271.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-13	1134	90%	100%	JN176088.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-3	1125	89%	100%	JN176080.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-8	1123	89%	100%	JN176085.1
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53150	1173	94%	99%	GU737284.1
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53575	1168	94%	99%	GU737286.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26756	1168	94%	99%	AF160307.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-17	1120	90%	99%	JN176090.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-14	1120	90%	99%	JN176089.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-7	1120	90%	99%	JN176084.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-4	1120	90%	99%	JN176081.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-19	1118	90%	99%	JN176092.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-18	1109	89%	99%	JN176091.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-6	1107	89%	99%	JN176083.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-5	1107	89%	99%	JN176082.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-1	1105	89%	99%	JN176078.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-2	1103	89%	99%	JN176079.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-11	1086	87%	99%	JN176087.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-10	1074	86%	99%	JN176086.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26757	1162	94%	99%	AF160308.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25346	1157	94%	99%	AF160296.1
<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain FCC 1092	1151	94%	99%	EU921243.1
<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6742	1138	93%	99%	EU921242.1

<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6754	1144	94%	99%	EU921241.1
--	------	-----	-----	------------

Anexo XIII. Resultados del análisis Blast (NCBI) utilizando secuencias del gen factor de elongación (EF 1 α) del aislado MICMM-2. Máxima identidad de 99 al 100% con secuencias de cepas de *Fusarium* depositadas en GenBank.

Descripción	Max puntuación	Cobertura	Max identidad	No. Accesoión
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53575	1157	97%	100%	GU737286.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-7	1110	93%	100%	JN176084.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-1	1095	92%	100%	JN176078.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26756	1148	97%	99%	AF160307.1
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53135	1142	97%	99%	GU737270.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 26757	1142	97%	99%	AF160308.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-3	1085	92%	99%	JN176080.1
<i>Fusarium mexicanum</i> strain MXJAL-8	1083	92%	99%	JN176085.1
<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25346	1139	97%	99%	AF160296.1
<i>Fusarium</i> sp. KO-2010a strain NRRL 53150	1131	97%	99%	GU737284.1
<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain FCC 1092	1128	97%	99%	EU921243.1
<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6742	1119	96%	99%	EU921242.1
<i>Fusarium</i> sp. AJ-2008b strain MRC 6754	1121	97%	99%	EU921241.1