

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



TESIS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENOTÍPICA DE POBLACIONES DE
***Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO**
***(Mangifera indica* L.) EN SINALOA.**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

LORENA MOLINA CÁRDENAS

DIRECTOR:

DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

CO-DIRECTOR

DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ

CULIACÁN, SINALOA, DICIEMBRE DE 2021

La presente tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENOTÍPICA DE POBLACIONES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA MALFORMACIÓN DEL MANGO (*Mangifera indica* L.) EN SINALOA**” fue realizada por **LORENA MOLINA CÁRDENAS**, bajo la dirección del consejo particular que se indica, ha sido **APROBADA** por el mismo y **ACEPTADA** como requisito parcial para obtener el título de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR



DIRECTOR: _____

DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA



CO-DIRECTOR: _____

DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ



ASESORA: _____

DRA. MITZI DAYANIRA ESTRADA ACOSTA



ASESOR: _____

DR. FELIPE AYALA TAFOYA

Culiacán, Sinaloa, diciembre de 2021.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y por permitirme cumplir una más de mis metas.

A mi hija Aylén Isabella por ser mi principal inspiración y fortaleza para superarme cada día y ser una mejor persona, para que en el futuro te sientas orgullosa de mí, eres lo más importante en mi vida, con tus abrazos y besos me motivas a seguir. Te amo hija.

A mi esposo Leonardo, mi compañero de vida, gracias por tu apoyo incondicional en todo momento por encontrar las palabras correctas en los momentos difíciles y estar ahí para celebrar los logros y ser un buen padre para nuestra hija, tú formas parte de este logro por ayudarme durante la investigación del trabajo de Doctorado.

A mis padres Juana y Marcelino por darme la vida, enseñarme los valores y ser una buena persona, por estar ahí cuando sentía que no podía más y escucharme, incluso desvelarse conmigo durante el proceso de estudio para no dejarme sola y estar ahí en todo momento, apoyándome en mis decisiones e impulsarme a seguir adelante. Sé que con este logro se sentirán orgullosos de mí. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Raymundo, Jesús y Marcelino, por motivarme a seguir y apoyarme siempre, los quiero hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por darme la manutención para realizar mi trabajo de Doctorado.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, específicamente a la Facultad de Agronomía por brindarme el espacio y equipo para la realización de mi trabajo de Doctorado.

A mi director de tesis y amigo Dr. Carlos Alfonso, por aceptarme y ser parte de su equipo de trabajo, ser mi guía y estar ahí siempre que lo necesité sin importar el día y la hora, por enseñarme y motivarme a seguir, sin duda alguna sin su apoyo no habría sido posible terminar mi Doctorado. Muchas gracias.

A mis asesores de tesis les agradezco su apoyo, al Dr. López Urquídez por ayudarme, guiarme y destinar parte de su tiempo para atender mis dudas durante la investigación y apoyarme en los análisis estadísticos de los datos que se obtuvieron en los experimentos. A la Dra. Mitzi por estar al pendiente, atenderme cuando la necesité y por las observaciones para la mejora de mi trabajo de Doctorado. Al Dr. Tafoya por estar en disposición cuando lo necesitaba y por sus comentarios.

Al Dr. Sixto, mi amigo, por sus enseñanzas, por su apoyo, por su tiempo y lo más importante para mi, motivarme a seguir superándome día con día.

Al Dr. Vega Gutiérrez y al Dr. Tirado Ramírez, que son mis amigos, gracias por estar ahí cuando los necesité, siempre me ayudaron y apoyaron en mi trabajo de investigación.

También agradezco al Dr. Amarillas por su apoyo y a la Dra. Teresa de Jesús por sus sugerencias, observaciones y escucharme cuando lo requería.

A mis compañeros de laboratorio Flor, Alfredo, Jorge y Alan, quienes formaron parte de esta etapa de mi trabajo de Doctorado, con ellos trabajé en equipo y me apoyaron.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. OBJETIVOS	4
4.1. Objetivo general	4
4.2. Objetivos específicos	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
5.1. Origen y distribución del mango	5
5.2. Estadísticas del cultivo del mango	5
5.2.1. Estadísticas del cultivo del mango a nivel mundial	5
5.2.2. Estadísticas del cultivo del mango a nivel nacional	6
5.3. El cultivo del mango	7
5.3.1. Clasificación taxonómica del mango	7
5.3.2. Descripción botánica del cultivo del mango	7
5.3.3. Requerimientos agroclimáticos	9
5.3.4. Variedades de mango	10
5.4. Limitantes del cultivo del mango	11
5.4.1. Enfermedad de la malformación del mango (MMD)	12
5.4.2. Malformación floral (inflorescencia) o proliferación floral	12
5.4.3. Malformación vegetal o proliferación vegetativa	13
5.4.4. Etiología y ciclo de la enfermedad	14
5.4.5. Vectores	15
5.4.6. Variedades susceptibles y estimación de severidad	15
5.5. Ensayo de patogenicidad mediante inoculaciones artificiales	16
5.6. Género <i>Fusarium</i>	17
5.6.1. Clasificación taxonómica	17
5.6.2. Identificación de <i>Fusarium</i>	19
5.6.2.1. Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp.	19
5.6.2.2. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp.	20
5.6.2.2.1. Extracción de ADN	20
5.6.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
5.6.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	21
5.6.2.3. Cebadores para la identificación de <i>Fusarium</i> spp.	22
5.6.2.3.1. Gen del Factor de Elongación de la Traducción (TEF-1 α)	22
5.6.3. Análisis filogenético	22
5.6.3.1. Unión de vecinos (Neighbor-Joining)	23
5.6.4. Tipos de apareamiento (locus MAT)	23
5.6.5. Enfermedades ocasionadas por el género <i>Fusarium</i> en mango	24
5.6.6. <i>Fusarium</i> spp. causante de la enfermedad de la malformación del mango (MMD)	25
5.6.6.1. <i>Fusarium</i> spp. en la malformación del mango en México	26
5.6.6.2. <i>Fusarium</i> spp. en la malformación del mango en Sinaloa	26
5.7. Descripción morfológica de las especies de <i>Fusarium</i> causantes de la MMD	26

5.7.1.	<i>Fusarium decemcellulare</i>	26
5.7.2.	<i>Fusarium proliferatum</i>	27
5.7.3.	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	28
5.7.4.	<i>Fusarium solani</i>	29
5.7.5.	<i>Fusarium incarnatum</i>	30
5.7.6.	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i>	31
5.8.	Interacción planta-hongo	31
5.9.	Patogenicidad del hongo	32
5.10.	Defensa de las plantas	33
5.11.	Control de <i>Fusarium</i> spp	34
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1.	Marco del muestreo y colecta de muestras	36
6.2.	Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	38
6.2.1.	Esterilización de material y preparación del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)	38
6.2.2.	Aislados de <i>Fusarium</i> spp.	38
6.2.3.	Cultivos monospóricos de <i>Fusarium</i> spp.	39
6.2.4.	Identificación morfológica de cultivos monospóricos de <i>Fusarium</i> spp.	39
6.3.	Extracción de ADN de los cultivos monospóricos	40
6.4.	Amplificación mediante PCR del Gen TEF-1 α y análisis electroforético	41
6.5.	Secuenciación enzimática y análisis de las secuencias	42
6.6.	Análisis filogenéticos	43
6.7.	Ensayo de patogenicidad de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. en plántulas de mango	43
6.8.	Determinación <i>in vitro</i> de la sensibilidad de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. a fungicidas comerciales	44
6.9.	Análisis de datos	46
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1.	Colecta de muestras	47
7.2.	Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp.	48
7.2.1.	<i>Fusarium decemcellulare</i>	48
7.2.2.	<i>Fusarium proliferatum</i>	49
7.2.3.	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	50
7.2.4.	<i>Fusarium solani</i>	51
7.2.5.	<i>Fusarium incarnatum</i>	51
7.2.6.	<i>Fusarium neocosmosporiellum</i>	52
7.3.	Identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp.	53
7.4.	Análisis filogenético	56
7.5.	Ensayo de patogenicidad en plantas de mango	58
7.6.	Determinación <i>in vitro</i> de la sensibilidad de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. a fungicidas comerciales	62
VIII.	CONCLUSIONES	63
IX.	LITERATURA CITADA	64
X.	ANEXOS	77

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

cm.: centímetros

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

CLA: agar de hoja clavel

cv: cultivar

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

g.: gramos

ha: hectárea

ICBN: Código Internacional de Nomenclatura Botánica

ITIS: Sistema Integrado de Información Taxonómica

km/h: kilómetros por hora

m: Metro

MMD: Enfermedad de la Malformación del Mango

mG: miligramos

mL: mililitros

mM: milímetros

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

PCNB: Pentacloronitrobenceno

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Papa dextrosa agar

PFV: Proliferación Vegetativa y Floral

pH: Potencial de Hidrógeno

SIAP: Sistema de información agroalimentaria y pesquera

t: tonelada

TEF-1 α : Factor de elongación de la traducción 1 alfa

VCG: Grupos de Compatibilidad Vegetativa

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Principales países productores de mango a nivel mundial	6
2	Producción nacional de mango	6
3	Muestras colectadas por región (municipio), número de huertas y número de muestras	37
4	Secuencias de iniciadores (D: directo, R: reverso), temperatura de alineamiento y el tamaño amplificado del gen TEF-1 α , MAT-1 y MAT-2 para el análisis de <i>Fusaria</i> y tipo de apareamiento.	41
5	Escala de clasificación de la malformación del mango (Iqbal <i>et al.</i> , 2006).	44
6	Fungicidas evaluados para el control de <i>Fusarium</i> spp. nombre comercial, ingrediente activo (i. a.) y dosis evaluadas en partes por millón (ppm).	45
7	Huertas de mango que se muestrearon, municipio, Ubicación y coordenadas geográficas.	47
8	Identificación morfológica de aislados patogénicos de <i>Fusarium</i> spp. por municipio.	48
9	Especies de <i>Fusarium</i> , aislados, variedad y tipo de muestra, origen y número de accesión del GenBank.	55
10	Análisis de varianza no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de rangos por Dunn ($p \leq 0.05$)	59
11	Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. bajo diferentes dosis de fungicida.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Página
1	Ruta de movimiento de los cultivares de mango desde su lugar de origen a diferentes países (Chakrabarty, 2011).	5
2	Malformación floral de forma suelta y compacta.	13
3	Síntomas de malformación vegetal	14
4	Ciclo de la enfermedad propuesto por Gamliel-Atinsky <i>et al.</i> (2009).	15
5	Características de <i>F. decemcellulare</i> . A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias.	27
6	Características de <i>F. proliferatum</i> . A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias.	28
7	Características de <i>F. pseudocircinatum</i> . A) Fiálides, B) Hifas enrolladas estériles, C) Microconidias, D) Macroconidias.	29
8	Características de <i>F. solani</i> . A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias.	30
9	Características de <i>Fusarium incarnatum</i> . 1 y 2 conidioforos, 3 clamidosporas y 5 Macroconidia (Ayoubi y Soleimani, 2016).	30
10	Características de <i>Neocosmospora vasinfecta</i> . A) Peritecio, B) Ascosporas, C) Ascosporas con 8 ascosporas.	31
11	Mapa de Sinaloa, donde se observan los municipios que se muestrearon.	36
12	Síntomas de malformación observadas en huertas que se muestrearon.	37
13	Siembra de la muestra en placa Petri con medio de cultivo PDA.	38
14	Proceso de dilución seriada y cultivo monospórico.	39
15	Cultivo monospórico en CLA e identificación morfológica.	39
16	Extracción de ADN de los aislados de <i>Fusarium</i> spp, con nitrógeno líquido y concentración de ADN.	40
17	Cargado de muestras, corrida electroforética y gel de agarosa en expuesto en el transiluminador de UV.	42
18	Proceso de siembra e inoculación artificial de aislados de <i>Fusarium</i> spp. en plantas de mango.	43
19	Procedimiento de la técnica de alimento envenenado.	45
20	Características morfológicas de <i>Fusarium decemcellulare</i> . a) cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias (5 µm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).	49
21	Características morfológicas de <i>Fusarium proliferatum</i> . a) cultivo monospórico en medio PDA, b y c) fiálides, d) microconidias y macroconidias, e) clamidospora intercalada en medio de cultivo PDA (5 µm bar), f-i) síntomas de malformación, j) planta sana (testigo).	50

22	Características morfológicas de <i>Fusarium pseudocircinatum</i> . a) cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias en medio de cultivo PDA (5 µm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).	50
23	Características morfológicas de <i>Fusarium solani</i> . a) cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides; c) microconidias y macroconidias, d) esporodoquios en medio de cultivo PDA (5 µm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).	51
24	Características morfológicas de <i>Fusarium incarnatum</i> . a) cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias; e) esporodoquio y clamidosporas en forma de cadena en medio de cultivo PDA (5 µm bar), f-i) síntomas de malformación, j) planta sana (testigo).	52
25	a-c. Características morfológicas de <i>Fusarium neocosmosporiellum</i> y d-g <i>Neocosmospora vasinfecta</i> ; a) cultivo monospórico en PDA, b) microconidias, c) macroconidias (10 µm bar), d) exudación de peritecios, e) peritecios (50 µm bar), f) ascos con ochos ascosporas unilaterales (5 µm bar), g) ascosporas con pared ornamentada (10 µm bar), h-k) síntomas de malformación, l) planta sana (testigo).	53
26	Producto amplificado de PCR de <i>Fusarium</i> spp. Carril 1 marcador de tamaño molecular Hypper Lader IV; carriles 2-8 aislados seleccionados (20FASIN, 128FRSIN, 66VRSIN, 111VRSIN, 163VCSIN, 6 VASIN y 13FASIN); carril 9 control negativo (sin ADN).	53
27	Filograma con el método de Neighbor-Joining para el gen TEF-1α de <i>F. incarnatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. pseudocircinatum</i> , <i>F. neocosmosporiellum</i> , <i>F. solani</i> y <i>F. decemcellulare</i> . Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 réplicas). Como grupo externo a <i>Neonectria ditissima</i> (JF735783). Las secuencias del presente estudio se observan en negrita.	57

RESUMEN

La enfermedad de la malformación del mango (MMD, por sus siglas en inglés) es una de las principales enfermedades que atacan al cultivo del mango y por ende limita su producción tanto a nivel mundial como nacional. En el periodo de 2017-2018 se obtuvieron un total de 168 aislamientos de árboles de mango con síntomas de malformación floral y vegetal como flores compactadas y deformadas, brotes laterales, agallas y masas compactadas en Sinaloa, México. Los aislados patogénicos se identificaron con base a características morfológicas. De un total de 80 aislados patogénicos, 37 fueron seleccionados para corroborar su identidad mediante el gen TEF-1 α , se identificó 1 aislado como *F. solani*, 1 de *F. neocosmosporiellum*, 1 como *F. proliferatum*, 5 aislados identificados como *F. pseudocircinatum*, 8 pertenecen *F. incarnatum* y 21 fueron como *F. decemcellulare*. Se demostró que los 25 aislamientos de *Fusarium* analizados para el tipo de apareamiento eran MAT-2. El análisis filogenético se separó por especie, así se confirmó que las poblaciones provienen de linajes distintos. Las seis especies produjeron síntomas de MDD, siendo la especie *F. decemcellulare* la que presentó mayor y menor agresividad. El fungicida Carbenpro promovió el menor crecimiento micelial de *Fusarium* spp. con las cuatro dosis utilizadas (1, 10, 100 y 1000 ppm), inhibiendo entre 55.08 y 76.71% el crecimiento del micelio, respectivamente.

Palabras clave: mango, caracterización genotípica, malformación, *Fusarium* spp.

ABSTRACT

Mango malformation disease (MMD) is one of the main diseases that attack the mango crop and therefore limits its production both globally and nationally. In the period 2017-2018, a total of 168 isolates of mango trees with symptoms of floral and plant malformation such as compacted and deformed flowers, lateral shoots, galls and compacted masses were obtained in Sinaloa, Mexico. The pathogenic isolates were identified based on morphological characteristics. Of a total of 80 pathogenic isolates, 37 were selected to corroborate their identity using the TEF-1 α gene, 1 isolate was identified as *F. solani*, 1 as *F. neocosmosporiellum*, 1 as *F. proliferatum*, 5 isolates identified as *F. pseudocircinatum*, 8 belong to *F. incarnatum* and 21 were as *F. decemcellulare*. The 25 *Fusarium* isolates analyzed for mating type were shown to be MAT-2. The phylogenetic analysis was separated by species, thus confirming that the populations come from different lineages. The six species produced symptoms of MDD, being the species *F. decemcellulare* the one that presented the highest and lowest aggressiveness. The fungicide Carbenpro promoted the lower mycelial growth of *Fusarium* spp. with the four doses used (1, 10, 100 and 1000 ppm), inhibiting between 55.08 and 76.71% the growth of the mycelium, respectively.

Keywords: mango, genotypic characterization, malformation, *Fusarium* spp.

I. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es el frutal de mayor importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, ocupando el primer lugar, seguido de la piña y el aguacate (FAO, 2012). México es el quinto productor a escala mundial (FAO, 2018) y el principal exportador (SIAP, 2013). De acuerdo con la superficie cultivada en México, este frutal en 2020 ocupó el quinto lugar, antecedido por café cereza (*Coffea arabica* L), naranja (*Citrus X sinensis* L), aguacate (*Persea americana*) y limón (*Citrus limon* L.) (SIAP, 2021). Los cultivares de mango más producidos son Ataulfo, Manila, Kent Tommy Atkins, Haden, Criollo, Keitt, Oro, Paraíso (petacón), Diplomático y Obo, que representaron el 31.63, 16.93, 13.05, 12.60, 11.6, 6.87, 5.55, 2.03, 0.14, 0.08 y 0.06 % de la producción de mango, respectivamente (SIAP, 2021). Se consume como fruta fresca o procesada en forma de conservas, salsas, encurtidos, helados, aguas, néctar, puré, fruta deshidratada y jugos.

En la mayoría de las zonas productoras de mango en México y el mundo se presenta una de las enfermedades más destructivas denominada “enfermedad de la malformación del mango” (MMD), “escoba de bruja” o proliferación vegetativa y floral (PVF), reportada por primera vez en India en 1891 (Krishnan *et al.*, 2009), misma que afecta brotes vegetativos y florales; destacando su severidad y control ineficiente, presentándose en la mayoría de las variedades cultivadas (Ploetz, 2007; Kumar *et al.*, 1993); las inflorescencias marchitas que permanecen en el árbol provocan el contagio de la enfermedad a yemas sanas (Gamliel- Atinsky *et al.*, 2009). En la actualidad se encuentra distribuida en China, Australia, Bangladesh, Brasil, Burma, Centroamérica, Cuba, Egipto, Estados Unidos de América, Filipinas, India, Indonesia, Israel, Malasia, México, Pakistán, Sudan, Tailandia, Venezuela (Qi *et al.*, 2013; Castellano y Guanipa, 2004; Ploetz *et al.*, 1996).

Las enfermedades causadas por el género *Fusarium* en plantas, han tenido gran impacto en los principales cultivos, tanto que, la mayoría de ellos tiene una enfermedad asociada a su presencia; una investigación reciente de la lista de enfermedades gestionadas por la Sociedad Americana de Fitopatología (APS),

reveló que más de 81 de las 101 plantas de importancia económica en la lista, presentan por lo menos una enfermedad asociada a *Fusarium*; las enfermedades inducidas varían en su forma, en nivel de gravedad y pueden incluir pudrición de tallo y raíz, marchitez, canchales, pudrición de fruto o semilla y hojas. Debido a ello, la identificación de las cepas de *Fusarium* presentes en plantas enfermas, ha sido y sigue siendo una actividad importante en los laboratorios de diagnóstico (APS, 2015).

Con base en el manejo integrado de esta enfermedad, se han realizado estudios y planteado alternativas de control, sin embargo, se siguen teniendo pérdidas económicas en las diferentes áreas productoras de mango en el país (Vega-Piña *et al.*, 2004). Los daños en los cultivares mejorados de tipo criollo y del tipo "petacón" son mayores en la cuenca del Pacífico y en el trópico seco de México, causando bajos rendimientos (Noriega *et al.*, 1999).

Se desconoce evidencia científica de las especies de *Fusarium* que ocasionan la malformación en el cultivo de mango en Sinaloa, por tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar dichas especies, así como determinar la virulencia de las poblaciones.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de malformación del mango, ocasionada por especies del género *Fusarium* causan pérdidas considerables en el cultivo, hasta en un 50 % (Noriega-Cantú *et al.*, 1999), cuando las condiciones son favorables para el patógeno. Sinaloa se encuentra en los primeros lugares de producción a nivel nacional, es de suma importancia realizar estudios que brinden información sobre la enfermedad que permitan diseñar estrategias sostenibles de control de la enfermedad. Hasta la fecha, la evidencia experimental para la susceptibilidad o resistencia de los cultivares comerciales a MMD no se ha publicado (Freeman *et al.*, 2014). Aunado a lo anterior, se desconoce evidencia científica de la diversidad de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en Sinaloa. Por ello, es importante identificar dichas especies, conocerlas y comprender la interacción planta-hongo.

III. HIPÓTESIS

Se encontrarán diferentes especies de *Fusarium* causando la malformación del mango en Sinaloa, las cuales presentarán diferentes niveles de virulencia.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente a los agentes causales de la malformación del mango en Sinaloa, así como determinar la patogenicidad y virulencia de las especies encontradas.

4.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente e identificar molecularmente a las especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa.
2. Determinar la patogenicidad y virulencia de los aislados de *Fusarium* spp. causantes de la malformación del mango en Sinaloa.
3. Determinar la relación filogenética de las poblaciones de *Fusarium* spp. causantes de la malformación del mango en Sinaloa.
4. Evaluar *in vitro* la sensibilidad a fungicidas de las cepas de *Fusarium* spp. causantes de la malformación del mango en Sinaloa.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Origen y distribución del mango

El mango (*Mangifera indica* L.) es un árbol frutal de importancia mundial, originario de la región Indobirmana, Laderas del Himalaya y Sri Lanka, de donde se distribuyó al resto del mundo. Por ello, además de la India, el mango se cultiva aproximadamente en 85 países. En la figura 1 se observan las principales rutas de movimiento de los cultivares de mango desde su lugar de origen (Chakrabarty, 2011). Esta especie a su vez es la de mayor importancia dentro de la familia Anacardiáceas, debido al valor económico del fruto y extensa distribución geográfica (Galán- Saúco, 2009).

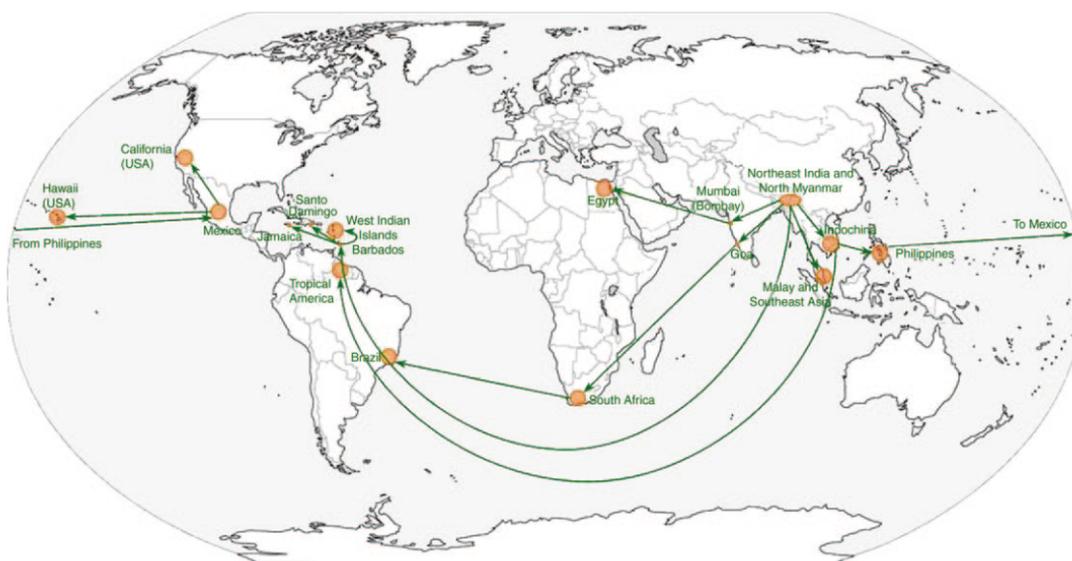


Figura 1. Ruta de movimiento de los cultivares de mango desde su lugar de origen a diferentes países (Chakrabarty, 2011).

5.2. Estadísticas del cultivo del mango

A continuación, se presentan datos que reflejan la importancia del mango dentro de la economía tanto a nivel mundial como nacional.

5.2.1. Estadística del cultivo de mango a nivel mundial

En el año 2019 a nivel mundial, México se posicionó en el cuarto lugar como productor de mango (Cuadro 1). Antecedido solo por India, Indonesia y China (FAOSTAT, 2021).

Cuadro 1. Principales países productores de mango a nivel mundial

País	Posición mundial	Producción (t)
India	1	253 631 000
Indonesia	2	3 294 817
China	3	2 415 000
México	4	2 396 675
Malawi	5	2 083 471
Brasil	6	1 998 561

Fuente: FAOSTAT, 2021.

5.2.2. Estadística del cultivo del mango a nivel nacional

En el año 2020 de acuerdo con las estadísticas de producción de mango, se obtuvo una producción aproximada de 2 085 751.18 t a nivel nacional, siendo Sinaloa el principal estado productor de mango (Cuadro 2), con una producción de 410 147.17 t; segundo lugar en cuanto a superficie sembrada con 33 891.97 ha; y un rendimiento de 12.83 t/ha (SIAP, 2021).

Cuadro 2. Producción nacional de mango

Estado	Posición nacional	Producción (t)	Rendimiento (t ha ⁻¹)
Sinaloa	1	410 147.17	12.83
Guerrero	2	395 477.31	15.64
Nayarit	3	304 618.62	11.38
Chiapas	4	270 644.12	7.56
Oaxaca	5	208 798.27	11.18

Fuente: SIAP, 2021

5.3. El cultivo de mango

El mango es una de las frutas más consumidas en el mundo debido a su sabor, fragancia y nutrición, aunado a que presenta bajos costos de mantenimiento, debido a su naturaleza resistente (Normand *et al.*, 2015).

5.3.1. Clasificación taxonómica del mango

La clasificación del mango dada por Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2011) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Suborden: Anacardiineae

Familia: Anacardiaceae

Género: *Mangifera* L.

Especie: *Mangifera indica* L.

5.3.2. Descripción botánica del cultivo del mango

Raíz: es pivotante, la cual crece hasta alcanzar el manto freático, pudiendo llegar hasta una profundidad de 6 metros, aunque la mayoría de las raíces absorbentes se encuentran en los primeros 50 cm. Además, el crecimiento horizontal puede ser hasta de 8 metros del tronco del árbol.

Tallo: la forma de ramificación del árbol depende de su forma de propagación, si es reproducido por semilla o injerto, y del tipo de poda que se aplique. En árboles reproducidos por semilla la ramificación es abundante y la planta puede llegar a más de 40 m de altura. En árboles injertados y podados la ramificación es menor llevando al final de las ramillas floríferas y su forma es simétrica, con la copa más o menos esférica (Huete y Arias, 2007).

Hojas: son lanceoladas de 15 a 40 cm de largo y de 2 a 10 cm de ancho, con un intenso color rojo al inicio de su crecimiento después pasa a color verde y termina como verde oscuro en su madurez.

Inflorescencia: es una panícula que varía de angosta hasta cónica y puede tener hasta 30 cm de largo.

Flores: son hermafroditas y masculinas en la misma panícula, predominan las masculinas. La corona tiene 5 pétalos de color amarillo, entre la corona y el androceo hay un disco penta-lobulado anular y carnoso. El androceo consta de estambres y estaminoides, en total 5 y solo en una o dos ocasiones son fértiles. La antera es rosa y se torna a purpura en la dehiscencia del polen. El ovario es sésil, unicelular, oblicuo y ligeramente comprimido, están colocados sobre el disco. Las flores se dan en panículas terminales ramificadas. Un árbol puede tener de 2000 a 4000 panículas, las cuales pueden poseer entre 400 a 5000 flores cada una. La polinización es cruzada, principalmente realizada por los insectos, especialmente las moscas (dípteros). Se considera normal que el cuaje sea de 0.1 % de las flores. La floración naturalmente está condicionada por el clima, principalmente por los factores temperatura y precipitación, como también el origen de la variedad, el manejo que recibe la misma y la madurez del tejido a florecer (yemas y hojas).

Fruto: es una drupa, de tamaño y forma variable, puede pesar de 100 a 1500 g; el mesocarpo constituye la parte comestible. Su color va de amarillo hasta rojo o morado, pasando por distintos grados de coloración en su proceso de madurez dependiendo de la variedad. La fruta pueda tardar de 100 a 120 días, en términos generales de la floración a cosecha. La fruta posee una cáscara semidura que la protege; la carne es fibrosa y se encuentra ligada a la semilla (Mora-Montero *et al.*, 2002).

Semilla: se encuentra dentro del endocarpio y hueso; la testa y tegmen están representados por dos cubiertas papiráceas, hay dos y rara vez más cotiledones, los cuales son planos, convexos y con frecuencia desiguales (Mora-Montero *et al.*, 2002; Huete y Arias, 2007).

5.3.3. Requerimientos agroclimáticos

Temperatura: la temperatura media mensual óptima para el desarrollo del cultivo de mango es de 22 y 33 °C; para proporcionar un sabor dulce a la fruta y que tenga una maduración adecuada, las temperaturas óptimas durante la noche deben ser de 28 a 32 °C; las temperaturas sub-óptimas son entre 10 a 23 °C como mínimas y de 31 a 42 °C como máximas; las temperaturas no aptas son debajo de 8 °C y arriba de 42 °C.

Precipitación: puede variar desde 250 hasta 500 mm, en regiones tropicales. El rango de adaptación de la especie va de 700 a 2500 mm, pero lo óptimo es entre 1000 y 1500 mm de precipitación al año con una temporada seca bien definida de aproximadamente cuatro meses de duración. Durante los primeros tres años del desarrollo de los arbolitos, es sumamente importante el suministro de riego. Cuando las precipitaciones son menores a 500 mm, es necesario aplicar riegos suplementarios.

Suelo: los suelos ideales para el cultivo del mango son de textura limosa, profundos y con una capa mínima de 75 cm de profundidad, aunque lo ideal son los suelos de 1 a 1.5 m de profundidad y un pH entre 5.5 y 7.0. El mango se desarrolla bien en suelos arenosos, ácidos o alcalinos moderados, siempre y cuando tengan una fertilización adecuada. Este frutal no es muy afectado por el tipo de suelo, sin embargo, en suelos mal drenados no crece, ni fructifica lo suficiente.

Altitud: las plantaciones productivas se limitan a una altitud máxima a 800 m.

Humedad relativa: la inducción floral se estimula por estrés hídrico, adaptándose bien a humedad relativa de 40 a 80 %, observándose que a humedad relativa mayor se propician enfermedades. Mientras que la sequía alta produce condiciones óptimas para diferentes plagas. El efecto de la humedad relativa se ha estudiado poco, se conoce que tienen un efecto directo en el intercambio gaseoso de las hojas e indirecto en crecimiento, floración y fructificación por la influencia que tiene en el desarrollo de plagas y enfermedades.

Viento: los vientos mayores de 20 km/h pueden causar problemas como volcamientos y deformación de plantas, daños mecánicos en hojas, flores y frutos,

secamiento de flores, reducción de la viabilidad del polen y caída de flores y frutos. También puede afectar la actividad de los insectos polinizadores.

Luminosidad: el mango no responde a las diferencias en la longitud del día, en cuanto a la diferenciación floral. Es poco tolerante a la sombra, por lo que requiere de buena luminosidad para el crecimiento, desarrollo reproductivo y rendimiento. Los frutos que están expuestos a la luz desarrollan un mejor color que los que reciben menos luz (Mora-Montero *et al.*, 2002; Huete y Arias, 2007)

5.3.4. Variedades de mango

Entre las variedades que se cultivan y aprovechan comercialmente en nuestro país están las siguientes (Chávez *et al.*, 2001):

Tommy Atkins: su fruto es de excelente calidad, predomina el color rojo, de forma redonda y tamaño mediano de 350 a 470 g. La pulpa es jugosa con poco contenido de fibra. Tiene la desventaja de que, si no se corta en su madurez óptima, se tienen problemas en el manejo postcosecha. Además, el fruto es afectado por un desorden fisiológico que consiste en un ahuecamiento interno en la unión del fruto con el pedúnculo.

Haden: fruto que presenta una base de color amarillo en chapeo rojo, que lo hace muy atractivo, tanto para el mercado nacional como para el de exportación. Los frutos alcanzan un peso de 300 a 400 g. Su pulpa es jugosa con poca fibra y de buen sabor.

Manila: Su producción es temprana, ya que se cosecha entre abril y mayo, produce frutos de peso medio de 200 a 275 g, de forma elíptica y de color amarillo, la cascara es delgada, pulpa amarilla, firme y muy dulce, cuenta con bajo contenido de fibra. Esta variedad es ampliamente aceptada en el mercado nacional, tanto para consumo en fresco como industrializado.

Kent: su producción es alternante. Los frutos pesan de 500 a 825 g; la base es de color verde amarillento con chapeo rojo. La desventaja de esta variedad es que la época de cosecha coincide con la temporada de lluvias, lo que favorece el desarrollo de antracnosis. La fruta se destina al mercado nacional principalmente y a la industria, sin embargo, su producción se puede destinar para exportación cuando se siembra en regiones secas.

Keitt: la producción de esta variedad es poco alternante y tardía, ya que se cosecha entre agosto y septiembre, destinándose al mercado nacional y para la industria. El fruto es grande, con un peso que varía de 600 a 800 g. La base del fruto es de color verde con chapeo rosa-rojizo. La pulpa es muy dulce con escaso contenido de fibra. La variedad tiene problemas de fruta manchada por antracnosis y roña.

Ataulfo: variedad poco alternante y producción temprana, ya que ocurre en mayo a julio. Su fruto ha tenido gran aceptación por su excelente calidad. Es de color amarillo, resistente al manejo y con peso promedio de 200 a 370 g. El color de la pulpa es amarillo y no tiene fibra.

Manzanillo Núñez: es una selección regional, su fruto es grande parecido al kent. El chapeo es rojo sobre amarillo-naranja, su pulpa no tiene fibra y la semilla es pequeña. Su producción se destina al mercado nacional.

Irwin: el color del fruto es rojizo con chapeo purpura. El peso oscila entre 250 y 310 g, la pulpa es de color amarillo intenso, no tiene fibra y exquisito sabor. Su defecto principal es que la fruta no resiste al manejo, por lo cual no es apta para exportación y su mercado nacional es limitado.

5.4. Limitantes del cultivo del mango

El mango padece varias enfermedades infecciosas causadas por fitopatógenos. Más de 83 enfermedades y trastornos diferentes, incluidos 52 fúngicos y tres bacterianos se han registrado en todo el mundo, nematodos fitoparásitos del árbol y la fruta del mango que causan pérdidas; sin embargo, el virus no causa una sola enfermedad hasta donde se sabe (Pernezny y Simone, 2000).

Dentro de los hongos, *Capnodium* sp. es el agente causal de la fumagina (Almeida *et al.*, 2003). Este fitopatógeno crece y se desarrolla a partir de micelio sin penetrar los tejidos de la planta, causando un efecto indirecto, ya que interfiere en las funciones normales de las hojas.

Por su parte, *Rosellinia* sp. causa la pudrición basal del mango y la raíz muere. Cuando se retira la corteza se puede observar el micelio del hongo de color blanco. El árbol tiene poco desarrollo, se torna amarillento y se le caen las hojas (Mora *et al.*, 2002).

Ceratocystis fimbriata ocasiona la enfermedad conocida como mal de machete, que causa marchitez y muerte de las ramas; en etapas avanzadas puede provocar la pérdida del árbol (Mora *et al.*, 2002).

Colletrotrichum gloesporoides ocasiona la enfermedad de antracnosis, afectando la producción del mango, las condiciones óptimas para que se desarrolle son altas precipitaciones, humedad relativa mayor de 82 %; los síntomas incluyen lesiones en hojas, ramas, flores, pedúnculos y fruto, reduciendo la producción entre el 15 y el 50 % (Arias y Canizales, 2007). Además, afecta el producto poscosecha.

Oidium mangiferae ocasiona el mildiu polvoso y se manifiesta en el cultivo por un tejido micelial de color blanco en forma polvoriento, los órganos principales afectados son las hojas jóvenes cercanas a la zona de formación de la panícula extendiéndose hacia las inflorescencia y ramas (Gil *et al.*, 2015).

5.4.1. Enfermedad de la malformación del mango (MMD)

La MMD puede definirse como una enfermedad fúngica en mango causada por especies del género *Fusarium* que conduce a un crecimiento anormal de los brotes vegetativos e inflorescencias (Kvas *et al.*, 2008). En México, fue detectada en los estados de Morelos, Veracruz y Guerrero en 1958 (Morales y Rodríguez, 1961); y actualmente se ha extendido ampliamente en todos los estados productores de mango.

La enfermedad presenta variación de síntomas y posiblemente se relacionan con diferentes fases de la patogénesis, cultivar, factores ambientales, especie de hongo y la edad del hospedante o tejido al momento de la infección (Chakrabarti, 2011).

5.4.2. Malformación floral (inflorescencia) o proliferación floral

Las inflorescencias sanas se caracterizan por tener un raquis central con entrenudos largos y ramificaciones secundarias con abundantes flores individuales que les confieren una estructura piramidal y un color amarillo dorado (Mora, 2000). Las panículas infectadas presentan engrosamiento del eje primario y raquis secundario, acortamiento de entrenudos y necrosis del raquis, adquiriendo una apariencia arrosada (forma suelta o compacta) (Figura 2). Las flores

malformadas tienen ovario de color verde y caen sin llegar a ser polinizadas. Las flores hermafroditas cambian a flores estaminadas, estériles y abortivas. Las panículas enfermas se marchitan hasta el final de la estación de fructificación y persisten como masas compactas carbonosas sobre los árboles hasta el ciclo siguiente (Olivas, 1979; Ram, 1991). Algunas panículas en estados tempranos de desarrollo pueden presentar apariencia estructural piramidal similar a las sanas, pero se pueden diferenciar de estas por desarrollar coloración verde-amarillenta (Marasas *et al.*, 2006). La proliferación floral puede coexistir en un mismo árbol junto con la proliferación vegetativa.



Figura 2. Malformación floral de forma suelta y compacta.

5.4.3. Malformación vegetal o proliferación vegetativa

Los brotes vegetativos sanos se caracterizan por la dominancia apical y ausencia de brotación lateral; mientras que los síntomas de proliferación provocan la pérdida de dominancia apical y se aprecian brotes laterales que salen de un mismo sitio (proliferación) y desarrollo de entrenudos cortos que causan achaparramiento de los tallos que le dan un aspecto arrosetado (Mora, 2000); las yemas axilares desarrollan multitud de brotes hasta formar una masa compacta (Ram, 1991; Noriega *et al.*, 1999) (Figura 3). Los brotes con malformación son más gruesos y las hojas son pequeñas (Marasas *et al.*, 2006). Cuando los síntomas son severos en el ápice de la planta se le conoce como bunchy top.



Figura 3. Síntomas de malformación vegetal

5.4.4. Etiología y ciclo de la enfermedad

El agente causal de la MMD, ha sido de suma importancia desde su inicio y es asociado con hongos, virus, ácaros, desbalances fisiológicos (metabólico, hormonal y otros factores), así como el estrés ambiental, suelo y desbalance nutrimental (Chakrabarti, 2011). Sin embargo, está confirmado que dichas alteraciones son inducidas principalmente por un hongo llamado *Fusarium mangiferae* (Ploetz *et al.*, 2002; Britz *et al.*, 2002).

Hasta 1999, el patógeno causante de la proliferación en mango, reportado diversamente como *F. moniliforme* (*Fusarium verticillioides*) y *F. subglutinans*, fue reconocido. Pero Britz *et al.*, (2002), mediante estudios moleculares de secuencias de ADN multilocus, redescubren el patógeno como *F. mangiferae*, también describieron una segunda especie (*F. sterilihyphosum*), encontrado también en Brasil (Lima *et al.*, 2009) causando la enfermedad. El ciclo de la enfermedad involucra varios factores, tales como esporas, vectores, viento, agua, herramientas. Gamliel-Atinsky *et al.* (2009) propusieron el ciclo de la enfermedad que incluye al ácaro de la yema del mango (*Aceria mangiferae*), mencionando que forma parte importante en la diseminación de la enfermedad, ya que en su cuerpo puede llevar esporas que esparce por los brotes vegetales o florales (Figura 4).

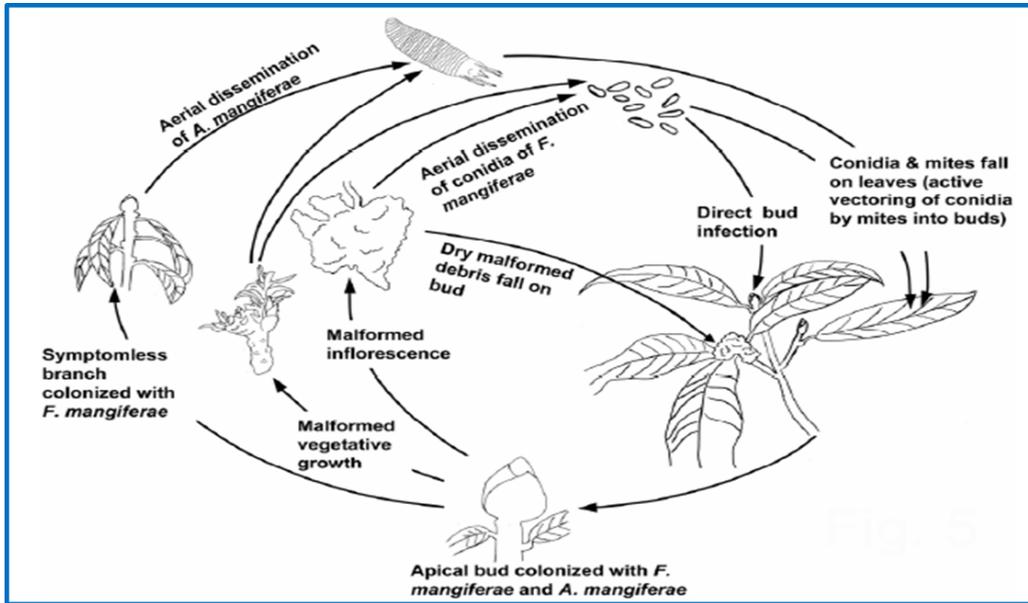


Figura 4. Ciclo de la enfermedad propuesto por Gamliel-Atinsky *et al.* (2009).

5.4.5. Vectores

Se ha encontrado relación entre el acaro de las yemas del mango (*Aceria mangiferae*) con la enfermedad (Kumar *et al.*, 1993). Los ácaros no ocasionan la enfermedad, pero es posible que, como transmisores, jueguen un papel importante (Pinkas y Gazit, 1992), además, favorecen el desarrollo de la enfermedad debido a las heridas que causan en los meristemas.

5.4.6. Variedades susceptibles y estimación de severidad

La susceptibilidad de las variedades a la malformación en mango es variable; los factores implicados que la regulan la enfermedad son temperatura, edad del árbol y fertilización. En general, se menciona que las variedades de floración tardía son menos susceptibles que los de floración temprana (Krishnan *et al.*, 2009). Rymbai y Rajes (2011) realizaron una revisión de la malformación de mango y señalan que ningún cultivar es completamente resistente a la malformación, sin embargo, el cv. Bhadauran se considera libre a la malformación.

Kumar *et al.* (1993) reportan que a nivel mundial se han realizado estudios de resistencia varietal con base en una escala de 9 grados (1 = resistente, 3 = moderadamente resistente, 5 = tolerante, 7 = moderadamente susceptible; 9 =

susceptible). En India, los cvs. Langra, Dashehri, Chausa y los híbridos Mallika y Amrapali fueron susceptibles (9 = >20 % índice de enfermedad). En Egipto, la enfermedad fue más severa en los cvs. Gylore, Mabrouka y Tamour, mientras que Zebda y Anshas Hindi rara vez son afectados.

Castellano y Guanipa (2004), en su estudio mencionaron que a los 45 días se observó la formación de agallas al inocular *Fusarium decemcellulare* y desarrollaron una escala con cuatro grados, de acuerdo a la frecuencia y longitud de lesiones. La escala consistió en: 0-0.45 = moderadamente resistente; 0.46-0.8 = moderadamente susceptible; 0.81-0.98 = susceptible; >0.98 = altamente susceptible. Al evaluar el comportamiento de cultivares, Palmer y Kent resultaron moderadamente resistentes y los más susceptibles Haden y Batista.

Iqbal *et al.*, (2006) propusieron una escala de cinco niveles con base en los síntomas de malformación que se observan: 1=yemas hinchadas; 2=erupción de yemas múltiples (vegetativa) o raquis engrosado (floral); 3=grupo de entrenudos cortos (vegetativo) o panícula engrosada (floral); 4=hojas escamosa (vegetativo) o aumento de flores (floral); 5=ápice compacto (vegetativo) o panícula compacta deformada (floral).

5.5. Ensayo de patogenicidad mediante inoculaciones artificiales

Las técnicas experimentales utilizadas para verificar la patogenicidad se han basado en métodos de infestación del suelo (Haggag *et al.*, 2010), deposición de micelio sobre heridas causadas de forma mecánica, aspersion de conidios, posibles vectores (*Aceria mangiferae*) e infiltración de esporas (Chakrabarti, 2011). Ploetz y Gregory (1993), reprodujeron satisfactoriamente los síntomas de malformación al insertar una porción (rodaja) de micelio de hongo. Iqbal *et al.* (2010), asperjaron esporas y frotaron con carborundum, pero no se manifestaron los síntomas de proliferación.

El método de infiltración de esporas con aguja hipodérmica se ha utilizado en los siguientes estudios:

- Noriega (1996) al inocular *F. subglutinans* y *F. oxysporum* en plantas de mango del cv. Haden y criollos, con una eficiencia del 75 al 100 %.
- Freeman *et al.* (1999) transformaron un aislamiento de *F. subglutinans* con

GUS (b-glucuronidase), inocularon yemas vegetativas y florales de mango (cv. Kent) y entre los 42-56 días observaron síntomas de MMD con una eficiencia del 100 %.

- Mora (2000) inoculó plantas de mango de tipo criollo con la especie *F. subglutinans* y presentó una eficiencia del 100 %.
- Lima *et al.* (2009) completaron satisfactoriamente los postulados de Koch de los aislamientos de la nueva especie de *Fusarium*, con una eficiencia del 20 al 60 %; mientras que con *F. sterilihyposum* fue del 20 al 40 % y con *F. semitectum* no se observaron síntomas.

5.6. Género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1809 y a tres siglos de su introducción se considera un género que posee una alta diversidad de patógenos de plantas. Las especies de este género, pueden provocar directamente enfermedades en plantas, animales y humanos. *Fusarium* spp. puede producir metabolitos secundarios asociados con enfermedades en plantas y en humanos como el cáncer y defectos de crecimiento. El género *Fusarium* tiene una diversidad de especies, formas especiales y razas.

El género constituye un grupo cosmopolita de hongos filamentosos, poseen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, sin embargo, algunas especies presentan un talo unicelular, están ampliamente distribuidas en el suelo y colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas, también pueden ser saprofitos y pueden sobrevivir en residuos vegetales. Se les considera principalmente como hongos de campo (Sulaman *et al.*, 2013), ya que son capaces de infectar a una gran variedad de cultivos de especies vegetales y producir enfermedades, que se manifiestan con síntomas como amarillez, marchitez, pudrición radicular, chancros y finalmente la muerte de muchos cultivos (Leslie y Summerell, 2006).

5.6.1. Clasificación Taxonómica

Comúnmente, la identificación de hongos fitopatógenos se ha basado en la observación y comparación de caracteres morfológicos de los especímenes; sin

embargo, en cada uno de los niveles taxonómicos, especie, subespecie, variedad, *formae specialis* (f. sp.) y raza, cada vez es menos el tipo de caracteres morfológicos que se consideran válidos para la diferenciación entre dichos grupos. Además, mientras que subespecies y variedades suelen diferir en algunos aspectos morfológicos, *formae specialis* y razas difieren morfológicamente en la gama de especies y de cultivares que estas infectan, respectivamente sobre las que son patogénicas (Coddington y Gould, 1992).

Los taxones reconocidos por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN), están basados en las características morfológicas de los individuos e incluyen sección, especie y variedades. Aunque algunas divisiones entre las especies de *Fusarium* están basadas en la fisiología como las formas especiales y razas, o en genética como los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (VCG), no están reconocidos por el código.

Con base a los taxones documentados por el ICBN, la clasificación taxonómica de estos hongos es la siguiente.

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Algunas especies tienen un estado sexual (teleomorfo) reconocido dentro de la familia Nectriaceae y pertenecen a los géneros *Gibberella*, *Nectria* y

Neocosmospora (Li *et al.*, 2013). Para evitar confusiones, solo el nombre de *Fusarium* se debe utilizar (Geiser *et al.*, 2013).

5.6.2. Identificación de *Fusarium*

La correcta identificación del agente causal, permite implementar medidas apropiadas para el manejo y control de las enfermedades. Hay varias técnicas de identificación de especies, como son los caracteres morfológicos del hongo, así como la identificación a través de métodos moleculares, por ejemplo, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es un enfoque rápido en la identificación de patógenos (O' Donnell, 2000), mediante el uso de regiones de ADN, como el gen del factor de elongación de la traducción (TEF-1 α), que se usan para identificar o discriminar a las especies del género *Fusarium* (O' Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004).

5.6.2.1. Identificación morfológica de *Fusarium* spp.

Esta técnica es tradicional y su uso es simple, sin embargo, importante. Se toman en cuenta los caracteres morfológicos de las colonias del hongo como son, el tipo de micelio, color de la colonia, estructuras como microconidias, macroconidias, fiálides, clamidosporas. Aunque su taxonomía continua vigente es indispensable la experiencia del técnico para una correcta identificación. Se hace uso de diferentes medios de cultivo para distinguir ciertas estructuras o la formación de algunas de ellas. Entre los medios de cultivo utilizados se encuentra al medio papa dextrosa agar (PDA) y agar hojas de clavel (CLA, por sus siglas en inglés). El PDA se utiliza para observar el tipo de micelio, coloración y diámetro de la colonia y en el medio CLA se observan las estructuras como las microconidias, macroconidias, fiálides, esporodoquios y clamidosporas. No obstante se requiere usar técnicas moleculares (PCR), ya que algunas de especies de *Fusarium* comparten características muy similares y la identificación morfológica puede ser errónea. Los manuales de identificación para el género *Fusarium* son los propuestos por Nelson *et al.* (1993); Leslie y Summerell, (2006).

5.6.2.2. Identificación molecular de *Fusarium* spp.

5.6.2.2.1. Extracción de ADN

Cuando se habla de análisis de ácidos nucleicos, es extraer el ADN del hongo y purificarlo. La cantidad del ADN y la calidad necesaria para las reacciones generalmente determinan el método de extracción que se emplea. Si los análisis de ADN se emplean para amplificaciones por PCR, la cantidad es relativamente poca. Hay varios métodos de extracción de ADN, por ejemplo, el protocolo de bromuro de trimetilamonio (CTAB) de Murray y Thompson (1980), así como también el método que utiliza nitrógeno líquido (Ausubel, 2003).

5.6.2.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, esto ocurre a través de varios ciclos repetidos en los que la secuencia específica es copiada. Para ello, la reacción requiere de la actividad de la ADN polimerasa, la cual posee la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. La PCR necesita de varios elementos importantes como son el ADN, la Taq ADN polimerasa, los oligonucleótidos, primers o cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{+}), solución buffer o amortiguadora y H_2O . Estos elementos interactúan en las tres etapas de la PCR que son: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay, 2013).

La enzima comúnmente utilizada es la Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, que se encuentra viviendo a muy altas temperaturas, por ello su ADN es capaz de soportar ese tipo de temperaturas, por lo cual es considerada como una enzima termoestable. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ella. Se requieren dos secuencias de primers llamada "forward" o sentido y la otra "reverse" o antisentido; diseñadas para que sean extendidas en la dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).

Los dNTPs son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN; el $MgCl_2$ es un cofactor necesario para la actividad

enzimática de la ADN polimerasa; el buffer o solución amortiguadora que se requiere está compuesto generalmente por Tris-HCL (pH=8), cuya concentración final debe ser 1X (Tamay, 2013). El equipo que se utiliza para esta técnica se llama termociclador, que está diseñado para que sea homogéneo en las condiciones de temperatura y tiempo necesario para que todos los ciclos sean iguales.

El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa se divide de tres etapas (Jiménez *et al.*, 2003):

1. Desnaturalización: el ADN se desnaturaliza en dos cadenas simples por fusión a una temperatura elevada (1 min. 90-95 °C)
2. Hibridación: anillamiento de dos oligonucleótidos (primers) en las cadenas originales para que se lleve a cabo la síntesis de la nueva cadena a una temperatura (45 seg. 40-60 °C), los primers tienen entre 10 y 30 bases de ADN.
3. Extensión: la nueva cadena se extiende a partir de los primers, añadiendo nucleótidos libres en forma de desoxirribonucleótidos trifosfatado (dNTPs) a una temperatura elevada (2 min. 70-75 °C).

El ciclo de estas tres etapas se repite de 25-35 veces en una región de PCR típica y generalmente tarda entre 2-4 horas, según sea la longitud del ADN a copiar. Para comprobar si el ADN amplificado se hacen corridas en geles de agarosa en electroforesis y ver si se observa el amplicon deseado.

5.6.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

La técnica de biología molecular que se usa para separar fragmentos dependiendo del tamaño de ADN, se llama electroforesis. Por lo regular en esta técnica se utilizan geles de agarosa donde se deposita el ADN y se lleva a cabo su separación, dependiendo del tamaño del fragmento. Esta separación se realiza generando un campo eléctrico en el gel de agarosa, en donde los fragmentos de ADN, al poseer carga neta negativa, migran hacia el ánodo, de manera inversa a su tamaño a causa de la fricción generada por el medio de gel agarosa (Vera, 2013). Una vez terminada la electroforesis, el gel se visualiza en un transiluminador de luz UV, así se observa el tamaño del fragmento amplificado y esto se logra gracias a que se agrega Gel Red a la agarosa, entonces se emite

una coloración brillante.

5.6.2.3. Cebadores para la identificación de *Fusarium* spp.

5.6.2.3.1. Gen del Factor de Elongación de la Traducción (TEF-1 α)

Actualmente, unas de las alternativas moleculares más utilizadas en el uso de la identificación filogenética de *Fusarium*, está basada en la secuencia nucleotídica del gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α o TEF-1 α), el cual codifica una parte esencial de maquinaria de traducción proteínica. Esta técnica se utiliza en la filogenética, ya que es bien conservado a nivel de especie dentro del género *Fusarium* y se han desarrollado cebadores universales que funcionan a través del género (Geiser *et al.*, 2004; Roger *et al.*, 1999), pues presenta una sola copia no ortóloga para este género. Este gen se utilizó por primera vez como marcador filogenético para inferir entre las especies y nivel de género de los lepidópteros (Cho *et al.*, 1995). Para el caso de las especies del género *Fusarium*, estos cebadores se desarrollaron para investigar linajes dentro del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (O' Donnell *et al.*, 1998). Estos iniciadores amplifican una región de ~750 pb del gen TEF-1 α flanqueando 3 intrones que proporcionan la mitad de la longitud del amplificado en todos los *Fusarium* que se conocen. Este gen es encontrado consistentemente en copia simple en *Fusarium* y muestra un alto nivel de polimorfismo, aun cuando es comparado con las porciones ricas en intrones de los genes que codifican proteínas como la calmodulina, β -tubulina e histona 3 (H3). Por ello el gen TEF-1 α se ha convertido en el marcador de elección como herramienta para la identificación de *Fusarium* spp. (Geiser *et al.*, 2004).

5.6.3. Análisis filogenético

Los análisis de secuencias de ADN o proteínas se han vuelto una importante herramienta para estudiar la historia evolutiva de los organismos (Yang y Rannala, 2012). La filogenia es el origen, formación y desarrollo evolutivo general de una especie biológica. Es usada para establecer la relación de parentesco entre especies o taxones en general. Para reconstruir la filogenia de un grupo taxonómico (familia, género, especie) es imprescindible construir matices con base en datos morfológicos y/o moleculares (ADN, ARN y proteínas).

La filogenética molecular se puede clasificar en tres métodos: métodos de

distancia, métodos de verosimilitud y métodos de parsimonia, utilizados para inferir en la filogenia de los organismos (Yang y Rannala, 2012).

5.6.3.1. Unión de vecinos (Neighbor-Joining)

Dentro del método de distancia se encuentra el método llamado de unión de vecinos (Neighbor-Joining), que se usan para reconstruir árboles filogenéticos a partir de datos de distancia evolutiva (Saitou y Nei, 1987).

El algoritmo Neighbor-Joining (NJ) o unión de vecinos fue creado por Saitou y Nei (1987) y consiste en generar un único “árbol filogenético” final. En el paso inicial del método, se unen los dos *neighbors* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este primer par formado al inicio se considera como una sola entidad, y busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. Así, el procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Saitou y Nei, 1987).

Este es uno de los métodos de distancia más extensivamente usados actualmente (Eguiarte, 1995). Es mucho más robusto a los problemas de diferencias en las tasas de substitución que el UPGMA y otros algoritmos, y se considera razonablemente rápido en la búsqueda (Eguiarte *et al.*, 1994).

Por otra parte, se ha demostrado que, si se emplea el análisis de distancia adecuado, el método puede ser tan bueno o mejor que los de parsimonia para encontrar el árbol filogenético verdadero (Nei, 1991; Hillis *et al.*, 1994).

5.6.4. Tipos de apareamiento (locus MAT)

El locus MAT determina el tipo sexual de los hongos, los genes MAT-1 y MAT-2, llamados ideomorfos, por tratarse de secuencias muy diferentes, que ocupan el mismo locus en el genoma (Turgeon, 1998; Souza *et al.*, 2003). Los genes del locus MAT poseen ciertas regiones conservadas entre especies distantes, que se denominan “Caja HMG” (en el idiomorfo MAT1-2 también llamado MAT-2) y “Caja alfa” (en el idiomorfo MAT1-1, también llamado MAT-1) (Souza *et al.*, 2003).

En los ascomicetos, el estudio de la estructura del locus ha ayudado a descubrir aspectos de la evolución de especies heterotálicas y homotálicas. Los genes MAT tienen el potencial de delimitar las fronteras entre especies y son útiles en estudios

evolutivos y para definir la filogenia (Conde-Ferrández, 2007).

La reproducción sexual de los hongos se lleva a cabo por la fusión de núcleos sexualmente compatibles para la posterior producción de esporas recombinantes. La compatibilidad reproductiva está determinada por un sitio específico del genoma denominada locus MAT, que define el tipo sexual o mating type, término usado para diferenciar entre individuos que son sexualmente compatibles (Souza *et al.*, 2003).

El tipo de apareamiento es dimítico, es decir, es controlado por un locus único, llamado locus de tipo de apareamiento (MAT), que se localiza en el cromosoma 6, con dos idiomórficos (MAT-1 y MAT-2). Este mecanismo es común para la mayoría de los Ascomycetes (Coppin *et al.*, 1997). En teoría, en los Ascomycetes filamentosos, el tipo de apareamiento es controlado por un locus único con dos alelos y la distribución de los alelos debería ser 1:1. Se ha descrito un extraordinario nivel de sintenia en la región del locus MAT entre hongos distantemente relacionados, como *A. nidulans*, *Magnaporthe grisea*, *N. crassa* y *Fusarium* spp. (Waalwijk *et al.*, 2002).

En el caso de *Fusarium* que es un género al que pertenecen fitopatógenos y productores de toxinas peligrosas para los humanos y animales; que incluye tanto hongos anamorfos como teleomorfos. Los genes MAT también se encuentran presentes en especies de *Fusarium* consideradas asexuales, e incluso son funcionales (Kerényi *et al.*, 2004), siendo firme con la hipótesis de que su fase sexual debe ser críptica o rara en la naturaleza y por ello no ha sido observada.

Pocas especies de *Fusarium* se han secuenciado, queda mucho trabajo por hacer con los MAT para determinar los genes que regulan y como estos genes facilitan el proceso de reproducción sexual (Leslie y Summerell, 2006).

5.6.5. Enfermedades ocasionadas por el género *Fusarium* en mango

Qi *et al.* (2013) observaron síntomas de muerte regresiva en árboles de mango, la enfermedad se caracterizó por grandes irregularidades de color marrón, motas en los pecíolos y ramitas, necrosis vascular, hojas secas y mortalidad completa de ramas. Se aisló al hongo que fue identificado como *Fusarium decemcellulare* Brick con base a su morfología e identificación molecular a través del gen TEF-1 α . Los

postulados de Koch se cumplieron mediante pruebas de patogenicidad. Hasta donde se sabe, es el primer informe de muerte regresiva en mango causada por *F. decemcellulare* en China. Salam *et al.* (2016) en su estudio identificaron a *Fusarium oxysporum* como agente causal de la marchitez en las plantas de mango en estado de vivero en Pakistán.

Omar *et al.* (2018), encontraron como agentes patógenos secundarios de la mancha foliar en mango a *F. proliferatum*, *F. semitectum* y *F. chlamydosporum*. La identificación fue por criterios morfológicos e identificación molecular, las pruebas de patogenicidad indicaron que es el primer reporte de la mancha foliar en Malasia por estas tres especies del género *Fusarium*.

Kausar *et al.* (2021) en su estudio señalan a *F. solani* y *F. oxysporum* como agentes causales de pudrición de frutos de mango de poscosecha en Pakistán. Guo *et al.* (2021) realizaron un estudio en China, donde encontraron que la mancha foliar del mango es ocasionada por 7 especies del género *Fusarium*. Las cuales fueron identificadas por medio de características morfológicas y técnicas moleculares. La patogenicidad se comprobó en los 22 aislados que se inocularon en las hojas de mango, las especies encontradas fueron *F. concentricum*, *F. hainanense*, *F. mangiferae*, *F. pernambucanum*, *F. proliferatum*, *F. sulawesiense* y *F. verticilloides* siendo este el primer informe donde se reportan a las especies causantes de la mancha foliar, excepto por *F. proliferatum*.

5.6.6. *Fusarium* spp. causante de la enfermedad de la malformación del mango (MMD)

La primera especie encontrada como agente patogénico causando la malformación del mango fue descrita y comprobada por Summanwar *et al.* (1966) que fue identificada como *Fusarium moniliforme*. El fitopatógeno más reconocido que causa la malformación del mango es el hongo *Fusarium mangiferae* (sinónimo: *F. subglutinans* (Wollenweb & Reinking) P. E Nelson, T. A Toussoun, & Marasas comb. nov.; basiónimo: *F. moniliforme* J. Sheld. var. *subglutinans*) (Kumar *et al.*, 1993). Sin embargo, hay especies que se suman a la lista de patógenos como es *Fusarium sterilihyphosum* asociado con la malformación del mango en Sudáfrica (Britz *et al.*, 2002). Asimismo, *Fusarium decemcellulare* causó la malformación en diez

cultivares de mango (Castellano y Guanipa, 2004). *Fusarium nivale* se reportó como primer informe en asociación con la enfermedad de malformación del mango en Pakistán (Khaskheli *et al.*, 2008). Además, *Fusarium proliferatum* fue reportado como agente causal de la malformación del mango en China. Para ello realizaron ensayos de patogenicidad mediante inoculaciones artificiales, los síntomas se observaron entre los 3 y 4 meses después la inoculación, comprobando su identidad por medio de técnicas moleculares y los postulados de Koch se cumplieron al re-aislar el agente causal (Zhan *et al.*, 2010). *Fusarium tuiense* fue reportada como primer informe causando la enfermedad en Senegal (Lamine *et al.*, 2012).

5.6.6.1. *Fusarium* spp. en la malformación del mango en México

En México, los patógenos que provocan la malformación del mango son *F. subglutinans* y *F. oxysporum* en Michoacán, Guerrero y Morelos (Mora, 2000; Noriega *et al.*, 1999). En estudios recientes se identificaron a *Fusarium mexicanum* (Otero-Colina *et al.*, 2010; Betancurt *et al.*, 2012) y *Fusarium pseudocircinatum* (Freeman *et al.*, 2014) como agentes patógenos de la malformación del mango.

5.6.6.2. *Fusarium* spp. en la malformación del mango en Sinaloa

En Sinaloa se reportó a *Fusarium decemcellulare* (Angulo y Villapudua, 1982), pero solo con base a características morfológicas. No existe información científica de las especies que causan la enfermedad.

5.7. Descripción morfológica de las especies de *Fusarium* causantes de la MMD

La descripción morfológica de *Fusarium* spp. se lleva a cabo con base en las características de la colonia (Nelson *et al.*, 1993; Leslie y Summerell, 2006).

5.7.1. *Fusarium decemcellulare*

Se encuentra con mayor frecuencia en las zonas tropicales, asociado con varias especies de árboles. Es un hongo de crecimiento lento, el color del micelio es blanco con color crema, que puede oscurecerse con la edad, producen esporodoquios amarillos a partir de una gota de exudado para dar una apariencia húmeda. Macroconidia de 42-95 x 4.5-8.5 µm suele ser muy larga, robusta y

gruesa, con curvatura en ambos lados lo que la hace diferente de las demás especies, puede presentar de 5 a 9 septos, generalmente 7 septos, suelen tener un tamaño uniforme. Microconidias de 5-28 x 2-5 μm de forma ovalada y no presenta septos, en micelio aéreo generalmente en cadenas largas, pero ocasionalmente en cabezas falsas en monifialides. Clamidosporas ausentes (Figura 5) (Leslie y Summerell, 2006). Es raro que se confunda a esta especie con otra debido a las características de las macroconidias. Presenta etapa sexual denominada *Albonectria rigidiuscula*.

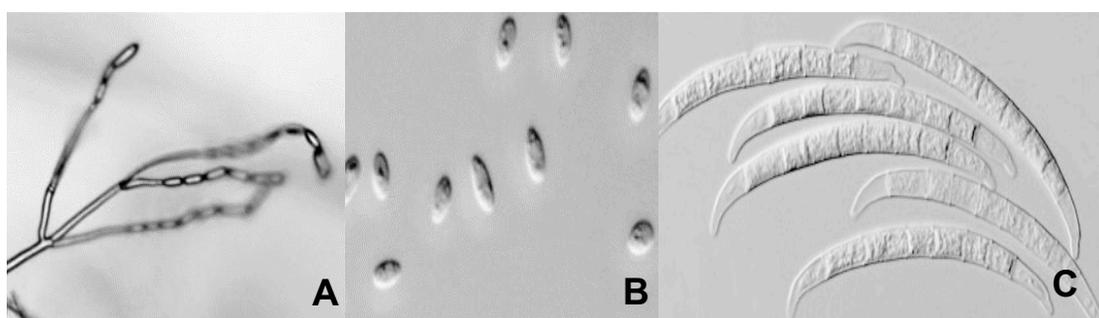


Figura 5. Características de *F. decemcellulare*. A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias (Leslie y Summerell, 2006).

5.7.2. *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum forma parte del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Se han realizado estudios que muestran las características morfológicas y filogenia molecular, los cuales revelaron que el FFSC está compuesto por más de 50 especies filogenéticamente diferentes (Geiser *et al.*, 2005). Los caracteres morfológicos no pueden diferenciar a *F. proliferatum* de *F. fujikuroi*, por lo tanto, se debe acudir a técnicas de apareamiento o secuencias de ADN.

Provoca enfermedades en el maíz, sorgo, mango y espárragos. El micelio del hongo es aéreo inicialmente es de color blanco, pero puede volverse violeta con la edad. Los esporodoquios son de color canela a naranja pálido se producen con poca frecuencia o difíciles de encontrar. Macroconidias de 29-69 x 2.6-5 μm son esbeltas, de paredes delgadas, relativamente recta y típicos producidos por el complejo de especies de *Giberella fujikuroi*. Normalmente de 3 a 5 septos.

Microconidias de 5-16 x 2-4.5 μm tienen forma de palo con una base aplanada y no presentan septos, pueden tener microconidias piriformes, pero son generalmente raras; producidas en monofialides y polifialides, habitualmente en cabezas falsas o agregados de microconidias. Clamidosporas ausentes (Figura 6) (Leslie y Summerell, 2006).

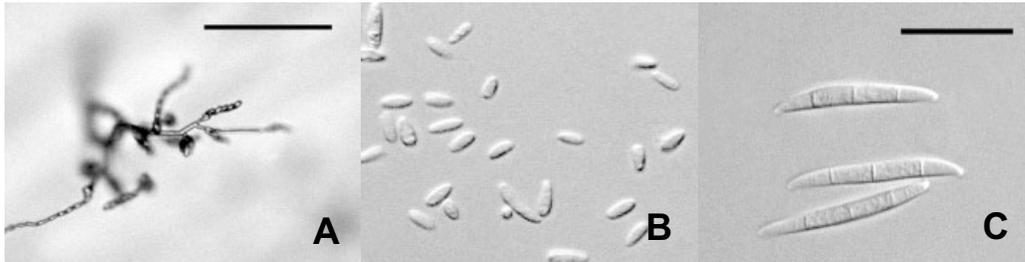


Figura 6. Características de *F. proliferatum*. A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias (Leslie y Summerell, 2006).

5.7.3. *Fusarium pseudocircinatum*

El micelio es algodonoso color blanco, produce pigmentos de naranja a violeta especialmente en el centro del cultivo. Esporodocios son raros y difíciles de encontrar. Macroconidias de 25-58 x 2-3.3 μm pueden presentar de 3 a 5 septos, cuando se presentan son ligeramente falcadas y delgadas. Predominan las de 3 septos. Microconidia 4-19 x 1.5-3.5 μm ovalada a ovoide, 0 a 1 septo, presentes en falsas cabezas (menos de 10 esporas), generalmente en monofialides, aunque ocasionalmente en polifialides. Clamidosporas ausentes. Presenta hifas enrolladas estériles, que son útiles al momento de identificar la especie (Figura 7) (Leslie y Summerell, 2006). Morfológicamente es similar a *F. circinatum* y *F. sterilihyphosum* como las tres especies que poseen hifas enrolladas, por lo tanto, pueden ser necesarias las técnicas moleculares para la identificación.

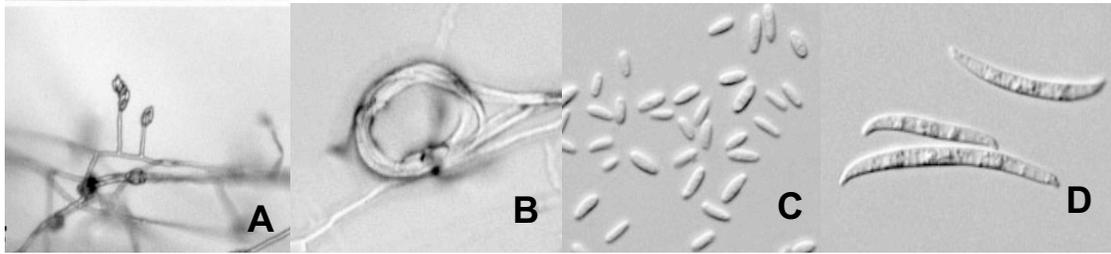


Figura 7. Características de *F. pseudocircinatum*. A) Fiálides, B) Hifas enrolladas estériles, C) Microconidias, D) Macroconidias (Leslie y Summerell, 2006).

5.7.4. *Fusarium solani*

Fusarium solani forma parte del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC). Entre las especies que forman parte de este complejo se dificulta la identificación morfológica, ya que todas las especies poseen características muy similares. Short *et al.* (2013), reportan que cuatro de las especies más comunes dentro del complejo de FFSC (*F. petroliphilum*, *F. keratoplasticum*, *F. falciforme* y *F. solani*) no pueden diferenciarse entres si con base a las características morfológicas.

F. solani es una especie cosmopolita sobre una variedad de sustratos. Es un patógeno de una gran variedad de especies vegetales, especialmente árboles. El micelio es de color blanco a crema con micelio escaso, algunos aislados producen tonos violetas o marrones. Esporodocios abundantes y pueden ser de color crema, azul o verde. Macroconidias con un tamaño de $29.5\text{--}50.3 \times 5.0\text{--}8.1\mu\text{m}$ son relativamente anchas, rectas y robustas, con los ápices redondeados. Con un número de septos que va de 5 a 7. Microconidias con un tamaño de $9.6\text{--}14.9 \times 4.0\text{--}6.3 \mu\text{m}$ son ovaladas, elipsoides, reniforme y fusiforme, pueden tener 0 o 1 septo, ocasionalmente 2, en cabezas falsas, a menudo en monofialides y bastante largas. Clamidosporas de $6\text{--}11 \mu\text{m}$ son abundantes, se encuentran intercaladas en las hifas o formadas terminalmente en ramas laterales cortas por lo general individualmente o en pares. Puede ser de forma globosa a ovalada y con pared suave o rugosa (Figura 8) (Leslie y Summerell, 2006). Esta especie tiene fase sexual llamada *Nectria haematococca*.

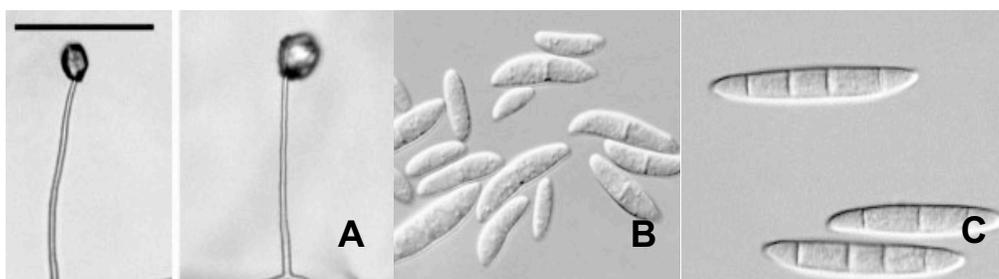


Figura 8. Características de *F. solani*. A) Fiálides, B) Microconidias, C) Macroconidias (Leslie y Summerell, 2006).

5.7.5. *Fusarium incarnatum*

Fusarium incarnatum forma parte del complejo de especies del *Fusarium incarnatum-equisietii* (FIESC). Las especies de FIESC se consideran comúnmente saprófitas y oportunistas, patógenos de plantas. También se han encontrado causando enfermedades en humanos (Jurado *et al.*, 2005). Las características de los rasgos morfológicos dentro de FIESC son muy limitadas y con ello, hasta ahora se ha permitido distinguir entre cuatro especies: *F. equiseti*, *F. lacertarum*, *F. scirpi* y *F. semitectum*. La tipificación de *F. semitectum* y sus supuestos sinónimos *F. pallidroseum* y *F. incarnatum* se vuelve confusa y por ello se necesita de más investigaciones (Leslie y Summerell, 2006). El FIESC está compuesto por 30 especies filogenéticamente distintas, que se dividen en dos clados designados *incarnatum* y *equiseti* (O'Donnell *et al.* 2009). Las macroconidias son ligeramente curvadas, afiladas en el ápice, de 4-5 septos con un tamaño de 21-42 x 3-5 μm . Las microconidias son fusiformes, hialinas y sin septos o con un septo de 10-12 x 3-4 μm . (Ayoubi y Soleimani, 2016) (Figura 9).

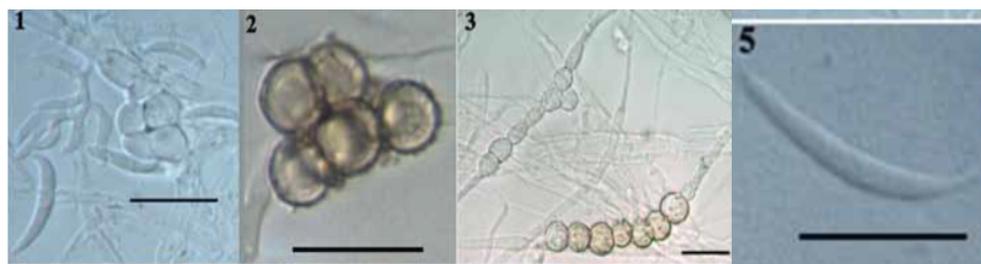


Figura 9. Características de *Fusarium incarnatum*. 1 y 2 conidioforos, 3 clamidosporas y 5 Macroconidia (Ayoubi y Soleimani, 2016).

5.7.6. *Fusarium neocosmosporiellum*

Fusarium neocosmosporiellum pertenece al complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC), las cuales son conocidas por causar enfermedades en plantas como chícharos, frijol, tomate y raíces de tubérculos (Leslie y Summerell 2006). La FSSC está constituida por más de 60 especies filogenéticas (Schroers *et al.* 2016). Actualmente, solo 23 especies filogenéticas han sido identificadas y sin ambigüedades forman parte de FSSC y son morfológicamente indistinguibles. (Short *et al.* 2013; Scheel *et al.* 2013).

F. neocosmosporiellum es la fase asexual de *Neocosmospora vasinfecta*. Su descripción se caracteriza por los peritecios, ascos y ascosporas. Los peritecios son de color vivo, rosáceos rojizos (a veces naranja), que miden hasta 0.2 mm, forma globular a subpiriformes con cuello pequeño; los ascos cilíndricos con 8 ascosporas unilaterales, de 80-100 x 10-12 μm ; las ascosporas uniseriadas, esféricas a ligeramente elípticas, con ornamentación llamativamente rugosa, a veces con gotitas de aceite y miden entre 9.5-10 x 9-10 μm . (Figura 10) (Calaca *et al.*, 2013).

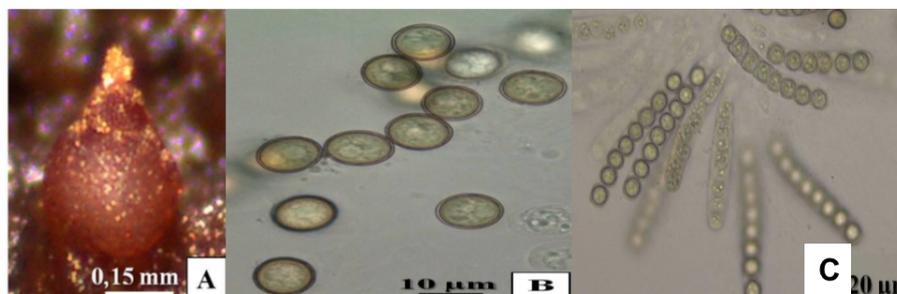


Figura 10. Características de *Neocosmospora vasinfecta*. A) Peritecio, B) Ascosporas, C) Ascus con 8 ascosporas (Calaca *et al.*, 2013).

5.8. Interacción hongo-planta

Los hongos del género *Fusarium* son ampliamente conocidos alrededor del mundo y se han convertido en un problema grave, ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en riesgo la salud de seres humanos y animales. Además, incluye muchos patógenos de cultivos de importancia agrícola que en conjunto ocasionan enfermedades que se caracterizan por marchitez, tizones y pudriciones, tanto en

ecosistemas agrícolas y naturales (Ma *et al.*, 2013). Este hongo emplea diversas estrategias de infección, como también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium*. El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como espora (clamidospora) en ausencia de anfitrión y cuando se encuentra cerca de la planta hospedera con las condiciones favorables, la infección puede iniciar en las raíces o en partes de la planta por encima del suelo, a través del agua o aire (Ma *et al.*, 2013). Para que la infección se lleve a cabo con éxito, la interacción entre hongo-planta responde a un proceso donde se movilizan diferentes conjuntos de genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a la superficie, la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa de compuestos antifúngicos del anfitrión, y la inactivación y la muerte de las células huésped por micotoxinas segregadas (Agrios, 2005).

5.9. Patogenicidad del hongo

Existen diversos estudios acerca de una amplia gama de hongos que convergen en la identificación de genes básicos de patogenicidad que codifican para componentes esenciales de las vías involucradas para las señales exógenas o endógenas, como las proteínas Ras (pequeñas GTPasas) los componentes de señalización de proteína G y sus vías descendentes, diversos complejos proteínicos (Ma *et al.*, 2013) y las cascadas de señales de traducción que son reguladores tanto para el desarrollo del hongo y como para su virulencia: el sistema de señalización del adenosin monofosfato cíclico dependiente de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Groenewald, 2006). Estas vías juegan un papel crucial en la formación de estructuras infectivas, tales como los apresorios y la secreción de una mezcla de enzimas hidrolíticas que se utilizan para penetrar el complejo de las barreras físicas del huésped, que incluyen quitinasas, pectinasas, celulasas y proteasas (Groenewald, 2006).

Las primeras señales de reconocimiento planta-hongo incluyen un factor de transcripción CTF1 β , que media constitutivamente la expresión del gen de quitinasa (*cut2*) que libera unos pocos monómeros de quitina de la planta. Esto desencadena la transcripción de CTF1 α , este es un mediador de la activación rápida del gen fúngico de quitinasa extracelular (*cut1*) para segregar dicha enzima

que sirve como factor de virulencia (Agrios, 2005). Las principales reacciones que genera la planta es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el incremento en el flujo de Ca^{+2} , de genes de defensa y la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas como las fitoalexinas, la callosa y lignina con capacidad de reforzar la estructura de la pared celular (García y Ruiz, 2005). Cuando la activación de estas respuestas es suficiente para evitar el crecimiento y reproducción del patógeno en el sitio de penetración, se obtiene una respuesta de hipersensibilidad (HR), que genera la muerte celular en el sitio de la invasión. Esta respuesta se observa en la mayoría de las interacciones incompatibles que se establecen entre un patógeno avirulento y una planta resistente, según la teoría gen por gen (García y Ruiz, 2005). Por ejemplo, *Fusarium oxysporum*, penetra inicialmente por la raíz de forma asintomática, se extiende y coloniza el tejido vascular, ocasionando un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de partes aéreas de la planta. En comparación con *F. graminearum*, que produce una necrosis limitada (Ma *et al.*, 2013).

Fusarium mangiferae sintetiza las citoquininas que son responsables de una parte del desarrollo anormal de la planta que es asociada con la enfermedad de la malformación del mango (Van Staden y Nicholson, 1989). En el caso de *F. decemcellulare* produce pigmentos de naftoquinona que puede ser componente importante de la patogenia de las plantas, ya que pueden funcionar como factores de virulencia inespecíficas, que inhiben la defensa de las plantas por hipersensibilidad (Medentsev y Akimenko, 1992).

5.10. Defensa de las plantas

Para evitar el daño de los patógenos las plantas desarrollan defensas como barreras físicas, estructurales, químicas y reacciones de hipersensibilidad (Agrios, 2005). Dentro de las defensas utilizadas por las plantas de mango se encuentra la mangiferina que es un polifenol no tóxico y un metabolito normal que se acumula durante la malformación del mango, que se encarga de la secreción de ácido fusárico y actúa como químico defensivo contra el hongo (Ghosal *et al.*, 1979). Dentro de las defensas químicas de las plantas biológicas tóxicas o inhibidoras se

encuentran los fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocininas, flavonoides, glucocinatos, lectinas, glucanas y quitinasas (Kliebeinstein, 2004).

5.11. Control de *Fusarium* spp.

El control de los organismos fitopatógenos del suelo es de los más difíciles de lograr, por ello se han desarrollado prácticas culturales, control biológico y químico, siendo el control químico el más utilizado por ser económico y eficaz, en comparación con otras medidas (Rubio *et al.*, 2008). Sin embargo, la generación de variedades resistentes constituye el avance de mayor importancia para el control de las enfermedades (González *et al.*, 2012). A continuación, se describen algunos tipos de control:

Control cultural. Dentro de estas prácticas se encuentran trabajos que se realizan al suelo (rastreos y subsuelos), eliminación de maleza, limpieza del equipo de trabajo, sembrar en diferentes épocas del año y la rotación de cultivos. Cuando se trata de los árboles de mango con malformación, la poda se debe realizar entre 30 y 50 cm por debajo del brote o flor malformada (Iqbal *et al.*, 2010).

Control biológico. Se utilizan diferentes hongos para el control de *Fusarium* spp. como lo es *Trichoderma* sp. existen diferentes estudios donde comprueban la acción inhibitoria que produce sobre especies de *Fusarium*. Chakraborty y Chatterjee (2008) utilizaron *Trichoderma* spp. para controlar la marchitez de la berenjena ocasionada por *Fusarium solani*, inhibiendo el 100 % del crecimiento del micelio del patógeno en condiciones *in vitro*.

Control con extractos naturales. Las mezclas de compuestos con propiedades antifúngicas encontradas en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de forma individual o por las mezclas en determinadas concentraciones. Por ejemplo, Jasso *et al.* (2007), estudiaron las propiedades de fungicidas de extractos etanólicos de tres especies de la llamada maravilla de campo (*Flourensia* spp.) en contra de *F. oxysporum*, donde el desarrollo micelial fue inhibido más del 90 % con el uso de los tres extractos.

Control químico. Los fungicidas son sustancias que se emplean para impedir el crecimiento o eliminar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas o animales. Los fungicidas son parte de una herramienta valiosa en el programa de manejo integrado de la enfermedad, sin embargo, debido a la variabilidad genética que existe dentro del género *Fusarium*, se dificulta seleccionar los fungicidas correctos para su control (Srivastava *et al.*, 2011). En el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. y otros hongos se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, que incluyen benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato (Agrios, 2005). Sin embargo, existen fungicidas que favorecen la formación de aislados resistentes a patógenos, es por ello que, para minimizar la aparición de resistencia, es necesario evitar la aplicación del mismo fungicida y lo ideal es alternar fungicidas que sean de distintos grupos químicos y diferente modo de acción.

Hay numerosos estudios acerca de la enfermedad, pero aún se carece de información sobre la compatibilidad sexual, morfología, patogenicidad y toxigenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas con la malformación del mango (Marasas *et al.*, 2006).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Marco de muestreo y colecta de muestras

El muestreo de los aislados se realizó durante el periodo 2017-2018, en huertas de mango del estado de Sinaloa, el cual se localiza a $25^{\circ} 00' 10''$ N y a los $107^{\circ} 30' 10''$ W y presenta una altitud máxima de 2800 m. Las coordenadas geográficas de cada huerta donde se realizó el muestreo se encuentra en el apartado de resultados.

El estado de Sinaloa se dividió en tres regiones, norte, centro y sur (Figura 11), que representó 5 municipios (Ahome, Culiacán, Navolato, El Rosario y Escuinapa).



Figura 11. Mapa de Sinaloa, donde se observan los municipios que se muestrearon (color naranja).

Dentro de la huerta, se realizó un muestreo dirigido, en árboles con síntomas de MMD (floral y/o vegetal). Con la finalidad de aislar e identificar morfológicamente y mediante técnicas moleculares a especies de *Fusarium* causantes de la malformación de mango, se tomaron muestras de la parte enferma del árbol (yemas vegetativas axilares o apicales e inflorescencia) (Figura 12). Se envolvió la muestra en papel periódico y colocaron en bolsas de ziploc rotuladas con la identificación correspondiente (número de muestra, huerta, municipio, coordenadas, variedad, edad y fecha). Se transportaron en hieleras de unicel hasta el laboratorio de Fitoprotección de la Facultad de Agronomía (UAS-Culiacán) para ser analizadas.



Figura 12. Síntomas de malformación observadas en huertas que se muestrearon.

Todos los puntos de muestreo fueron georreferenciados. En el cuadro 3 se observa las muestras colectadas por región, número de huertas y número de muestras.

Cuadro 3. Muestras colectadas por región (municipio), número de huertas y número de muestras.

Región	Municipio	Huertas	Muestras
Norte	Ahome	7	21
Centro	Culiacán-Navolato	9	24
Sur	El Rosario-Escuinapa	34	123
Total		50	168

6.2. Obtención de aislados de *Fusarium* spp.

6.2.1. Esterilización de material y preparación de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA).

Para la preparación del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se pesaron 39 g de medio PDA, que se depositaron en un matraz Erlenmeyer el cual se aforó a 1 litro con agua destilada, se agitó para homogenizar la muestra, sellando el matraz con papel aluminio. Posteriormente se colocó en la autoclave para ser esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, pasado este tiempo se retiró de la autoclave y se dejó enfriar, antes de vaciar el medio a placas de Petri, se agregaron 300 mg de sulfato de estreptomicina (para inhibir el crecimiento bacteriano) y 1.5 ml de pentacloronitrobenceno (PCBN) para hacer selectivo el crecimiento del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

6.2.2. Aislados de *Fusarium* spp.

De cada muestra colectada, se hicieron pequeños cortes longitudinales de 3 mm, mismos que fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min y etanol al 70 % por 2 min, enseguida se lavaron 3 veces con agua destilada colocados en papel absorbente. Ya secos los trozos, se sembraron en cajas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA-Difco) y se incubaron a una temperatura de 25 °C durante 5 días (Figura 13).



Figura 13. Siembra de la muestra en placa Petri con medio de cultivo PDA.

6.2.3. Cultivos monospóricos de *Fusarium* spp.

Para obtener los cultivos monospóricos de *Fusarium* spp, se tomó el micelio crecido en medio PDA, el cual fue diluido en 1 ml de agua destilada y a través de diluciones seriadas se sembraron en cajas Petri con medio PDA. A partir de ello se obtuvo el cultivo monospórico (Hansen y Smith, 1932). Los aislamientos se observaron al microscopio, ubicando esporas individuales germinadas, marcando el sitio sobre al agar y un fragmento de esta espora germinada se transfirió a una nueva caja de Petri con medio PDA, incubándose bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas (Figura 14).



Figura 14. Proceso de dilución seriada y cultivo monospórico.

6.2.4. Identificación morfológica de cultivos monospóricos de *Fusarium* spp.

La identificación de las especies de *Fusarium* se llevó a cabo en un microscopio óptico, con base en la morfología del micelio y microconidias en fiáldes propuestas por Leslie y Summerell (2006). Los aislamientos se cultivaron en medio PDA a 25 °C en oscuridad durante 6 días para observar el color de la colonia y la formación de micelio aéreo. Para la observar los caracteres morfológicos como macroconidias y microconidias, la disposición de las células conidiógenas y la presencia o ausencia de clamidosporas se incubaron los cultivos monospóricos a 28 °C, durante 14 días en medio de cultivo agar con hojas de clavel (CLA) (Figura 15).



Figura 15. Cultivo monospórico en CLA e identificación morfológica.

6.3. Extracción de ADN de los cultivos monospóricos

La extracción de ADN se realizó por el método descrito por Ausubel *et al.* (2003), para ello se recolectó el micelio raspando la superficie crecida en medio de cultivo PDA (incubado previamente a 25 °C durante 1 semana), se procedió a triturar y pulverizar el micelio contenido en nitrógeno líquido, con la ayuda de un pistilo esterilizado. La muestra pulverizada se agregó a un tubo Eppendorf de 2 ml, agregando 1 ml del buffer de extracción CTAB al 2 %, 100 mM de TrisCl (pH 8), 20 mM de EDTA (pH 8) y 1.4 M de NaCl, se homogenizó la muestra y se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se agregó 1 ml de Cloroformo-Isoamílico (49:1), se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min, de nuevo se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y añadió V/V de acetato de sodio 3M y V/V de isopropanol absoluto frio, se dejó reposar por 12 horas. Ya reposada la muestra se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min (decanto el contenido) y agregó 1 ml de etanol al 70 %, se centrifugó de nuevo a 14 000 rpm durante 5 min (decanto el contenido) quedando la pastilla de ADN, se dejó evaporar el alcohol, para finalizar el proceso se agregaron 50 µL de TE (Tris-EDTA), para conservar el ADN. La concentración y la calidad del ADN se estimaron utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Fisher Scientific) (Figura 16). Las muestras de ADN fueron conservadas a -20 °C para su posterior uso.



Figura 16. Extracción de ADN de los aislados de *Fusarium* spp, con nitrógeno líquido y concentración de ADN.

6.4. Amplificación mediante PCR del Gen TEF-1 α y análisis electroforético.

El ADN extraído de las muestras correspondientes a *Fusarium* spp., fueron amplificadas mediante la PCR, tomando en consideración las secuencias de iniciadores, así como las condiciones de amplificación, usando las siguientes: 1 ciclo a 94 °C, 5 min; 35 ciclos (94 °C, 1 min; 51 °C, 1 min; 72 °C, 2 min), un ciclo de extensión final a 72 °C, durante 10 min. La mezcla de reacción final fue de 25 μ L y contenía 1.0 μ L de ADN, una mezcla equimolar de dNTPs (10 mM), MgCl₂ (25 mM), amortiguador de PCR, 5U de *Taq* DNA polimerasa, primers (10 mM) de cada oligonucleótido EF1 y EF2 (TEF-1 α) propuestos por Geiser *et al.* (2004) y O'Donnell *et al.* (1998). Para todas las reacciones anteriormente mencionadas se utilizó un equipo termociclador. En el cuadro 4 se describen las secuencias de iniciadores (D: directo, R: reverso), temperatura de alineamiento y el tamaño amplificado del gen TEF-1 α para el análisis de *Fusaria* y el tipo de apareamiento (MAT-1 y MAT- 2) de los aislados se determinaron por la PCR (Leslie y Summerell, 2006).

Cuadro 4. Secuencias de iniciadores (D: directo, R: reverso), temperatura de alineamiento y el tamaño amplificado del gen TEF-1 α , MAT-1 y MAT-2 para el análisis de *Fusaria* y tipo de apareamiento.

Nombre del iniciador	Secuencias (5' \rightarrow 3')	T. de alineamiento	Tamaño del fragmento	Especie o tipo de apareamiento
EF 1 (D)	ATGGGTAAGGA(A/G) GACAAGAC	53 °C	700 pb	<i>Fusarium</i> spp. ^{ab}
EF 2 (R)	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT			
MAT-1 (D)	CGCCCTCTKAAYGSCTTCATG		200 pb	MAT-1 ^c
MAT-1 (R)	GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC	52 °C		
MAT-2 (D)	CGACCTCCCAAYGCYTACAT		800 pb	MAT-2 ^c
MAT-2 (R)	TGGGCGGTACTGGTARTCRGG			

D: primer directo, R: primer reversa.

a: O'Donnell *et al.* (1998).

b: Geiser *et al.* (2004).

c: Leslie y Summerell (2006).

Los productos amplificados se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1 %, teñidos con una solución de Gel Red 3X, para ello 3 μ l del ADN amplificado se mezcló con 1 μ l del colorante de azul de bromofenol 6X (Sambrook y Rusell, 2001), la mezcla se agregó a los pozos del gel de agarosa y como referencia se usó el marcador de peso molecular Hyper Ladder III. La solución amortiguadora de corrida y preparación de los geles de agarosa fue NaOH-Borato 1X (Brody y Scott, 2004). El tiempo de corrida fue de 40 min a 150 V y para visualizar el ADN, el gel se expuso a un transiluminador de luz UV (Figura 17).

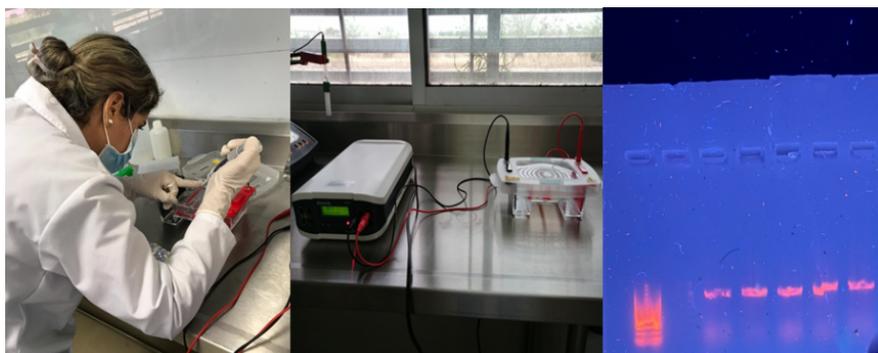


Figura 17. Cargado de muestras, corrida electroforética y gel de agarosa expuesto en el transiluminador de UV.

6.5. Secuenciación enzimática y análisis de las secuencias

Las muestras se enviaron a Korea del Sur a la empresa Macrogen, basada en el método ddNTPs (Sanger *et al.*, 1977) para la purificación y secuenciación.

La búsqueda de similitud entre secuencias de ADN se realizó por medio del programa BLAST (Programa Informático de Alineamiento de Secuencias de tipo Local) (Altschult *et al.*, 1990), con el cual se compararon las secuencias de nucleótidos en estudio, con la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información de Biotecnología) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de esta manera se identificaron los valores de homología. La identificación de los aislados fue confirmada vía BLAST en las bases de datos del NCBI, *Fusarium* ID y *Fusarium* MLST.

6.6. Análisis filogenéticos

Las secuencias TEF-1 α se alinearon con las secuencias de referencia de *Fusarium* obtenidas de GenBank utilizando la alineación múltiple en Clustal W con el software Geneious R9, y se infirieron relaciones filogenéticas con base en la alineación de secuencias de nucleótidos del gen entre los aislados de *Fusarium*. Los árboles se construyeron mediante el método Neighbor-Joining en función de las distancias determinadas por el método de Jukes y Cantor utilizando 1000 réplicas de arranque.

6.7. Ensayo de patogenicidad de cepas de *Fusarium* spp. en plantas de mango

Una vez identificadas las cepas de *Fusarium* spp. se procedió a realizar los postulados de Koch, para saber cuáles cepas eran patogénicas, para ello se recolectaron semillas de mango criollo y se sembraron en camas de aserrín. Una vez germinadas se transfirieron a bolsas negras de 18 x 26 cm con tierra de aluvión. Para la preparación del inóculo se tomó un trozo del micelio crecido y transfirió a medio de cultivo PDA, se incubaron durante 7 días, posteriormente se colocó el micelio en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de agua destilada esterilizada para hacer el conteo de los conidios, los cuales se ajustaron a 1×10^6 conidios/ml (suspensión conidial), se realizó la inoculación de las plantas con base a lo descrito por Freeman *et al.* (1999). Se inocularon 5 nudos por planta y 5 plantas por cepa, las plantas tenían aproximadamente de dos a tres meses de edad, teniendo un total de 168 aislados de *Fusarium* spp. (Figura 18).



Figura 18. Proceso de siembra e inoculación artificial de aislados de *Fusarium* spp. en plantas de mango.

La severidad de la enfermedad se estimó mediante una escala de clasificación de 1 a 5, según lo descrito por Iqbal *et al.* (2006). Con modificaciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Escala de clasificación de la malformación del mango (Iqbal *et al.*, 2006).

Valor	Síntoma
0	Planta sana
1	Hinchazón de las yemas para malformaciones vegetativas y florales
2	Erupción de múltiples brotes (vegetativos) o raquis cortos y gruesos (florales)
3	Brotes agrupados con entrenudos acortados (vegetativos) o panícula engrosada (florales)
4	Hojas pequeñas escamosas (vegetativos) o flores agrandadas (florales)
5	Ápice bunchy (vegetativos) o panícula compacta deformada (florales)

El índice de severidad de la enfermedad (DSI) se calculó con la fórmula propuesta por Galanihe *et al.* (2004):

$$DSI = \sum [P \times Q / M \times N] \times 100$$

Donde P = punto de severidad; Q = número de plantas infectadas con alguna escala; M = número total de plantas observadas; N = máxima clasificación en el número de la escala.

6.8. Determinación *in vitro* de la sensibilidad de los aislados de *Fusarium spp.* a fungicidas comerciales

Se determinó la sensibilidad *in vitro* en el crecimiento relativo de los aislados. Se evaluaron cuatro fungicidas sistémicos (Carbenpro, Cercobin M, Naria top y Cabrio C) y dos fungicidas de contacto (Dithane y Trenavil), los cuales se evaluaron individualmente. Se empleó la técnica de alimento envenenado Dhingra y Sinclair, (1985) (Figura 19) adicionando los fungicidas al medio del cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se evaluaron 4 dosis (Cuadro 6) con base a lo descrito por Alberoni *et al.* (2005) and Avenot and Michailides (2007). Se hicieron 2 repeticiones por dosis de fungicida y se evaluaron 6 aislados (20FASIN, 26FRSIN, 66VRSIN, 128FRSIN, 163VCSIN y 175VNSIN), se utilizó un control (sin fungicida). Se agregó a las cajas Petri un disco de 0.77 cm de diámetro que contiene la colonia

crecida de manera que este quedó sobre el PDA. Todas las cajas Petri (incluyendo el control) fueron incubadas durante 7 días a 25 °C.



Figura 19. Procedimiento de la técnica de alimento envenenado.

Cuadro 6. Fungicidas evaluados para el control de *Fusarium* spp. nombre comercial, ingrediente activo (i. a.) y dosis evaluadas en partes por millón (ppm).

Nombre comercial	Ingrediente activo (i.a.)	Dosis (ppm)			
		D1	D2	D3	D4
Naria Top	Pyraclostrobin + dimetomorf	1	10	100	1000
Cabrio C	Boscalid + pyraclostrobin	1	10	100	1000
Cercobin M	Tiofanato metílico	1	10	100	1000
Carbenpro	Carbendazim	1	10	100	1000
Dithane	Mancozeb	1	10	100	1000
Trenavil	Clorotalonil	1	10	100	1000

La valoración de la sensibilidad se determinó bajo la propuesta planteada por el FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, 1992), donde el cálculo se hace a partir del crecimiento relativo (CR) expresado por:

$$CR = (DMCF/CMCT) \times 100$$

Donde, CMCF es el diámetro medio de la cepa crecida en medio PDA con una concentración determinada de fungicida. CMCT es el diámetro de la cepa crecida en medio PDA sin fungicida (testigo).

6.9. Análisis de datos

Los datos obtenidos no cumplieron con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, aun después de haberse sometido a transformación de raíz cuadrada. Por lo tanto, se realizó un análisis no paramétrico a partir de los datos obtenidos en los ensayos de patogenicidad y evaluación del porcentaje del crecimiento relativo de los aislamientos con los fungicidas, realizando la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación de medias con la prueba de Dunn ($p \leq 0.05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software XLSTAT (Addinsoft, 2020).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Colecta de muestras

Se realizó la colecta de muestras en 40 huertas de mango del estado de Sinaloa, con síntomas de la enfermedad (Cuadro 7).

Cuadro 7. Huertas de mango que se muestrearon, municipio, ubicación y coordenadas geográficas.

Huerta	Municipio	Ubicación	Coordenadas geográficas
1	Ahome	Ejido porvenir- La chikis	25° 56' 01.12" N 109° 05' 18.35" O
2	Ahome	Ejido porvenir- El remate	25° 56' 08.71" N 109° 05' 12.03" O
3	Ahome	Cherry	25° 55' 42.56" N 109° 05' 37.36" O
4	Ahome	La escuela	25° 55' 45.93" N 109° 05' 59.49" O
5	Ahome	Lipe	25° 56' 32.62" N 109° 03' 17.68" O
6	Ahome	CHEBO VLZA	25° 52' 55.49" N 109° 00' 58.60" O
7	Culiacán	Eldorado-frente a rumba	24° 19' 52.07" N 107° 22' 02.67" O
8	Culiacán	Eldorado-perical	24° 21' 50.81" N 107° 22' 12.78" O
9	Culiacán	Higueras de achota	24° 19' 03.49" N 107° 20' 16.05" O
10	Culiacán	Centro Inv. Unión cañera Eldorado	24° 34' 21.27" N 107° 26' 41.71" O
11	Navolato	Justo antes de llegar	24° 76' 60.99" N 107° 70' 22.47" O
12	Navolato	Frente a Mariscos Mariyita	24° 75' 83.33" N 107° 63' 27.78" O
13	Navolato	Cobaes 46, lado canal en San Pedro	24° 77' 05.56" N 107° 59' 33.33" O
14	El Rosario	Ejido Potrerillos	23° 02' 75.00" N 105° 94' 58.93" O
15	El Rosario	Ejido Potrerillos- Grupo Valroch	23° 02' 75.57" N 105° 94' 65.98" O
16	El Rosario	Empaque Juan de Dios	22° 98' 08.33" N 105° 84' 13.89" O
17	El Rosario	Ejido Tazajal- Noria 1	22° 92' 77.78" N 105° 83' 61.11" O
18	El Rosario	Ejido Ponce-El profe	22° 93' 80.56" N 105° 82' 11.11" O
19	El Rosario	Ejido Ponce-Señor Jaime	22° 93' 85.76" N 105° 83' 21.19" O
20	El Rosario	Ejido Pozole- Rodolfo Ceballos	22° 91' 47.22" N 105° 91' 33.33" O
21	El Rosario	Ejido Pozole- Frente a Gasolinera	22° 91' 59.32" N 105° 91' 53.12" O
22	El Rosario	Montealto-llegada puente	22° 91' 16.67" N 105° 89' 61.11" O
23	El Rosario	Antes de laguna de beltranos	22° 95' 35.51" N 105° 91' 37.30" O
24	El Rosario	Estación Rosario- Emp. Don Jorge	22° 98' 72.74" N 105° 87' 58.20" O
25	El Rosario	Chametla- lado derecho del rio	22° 87' 94.43" N 105° 96' 28.97" O
26	El Rosario	Reforma a Emiliano Zapata	22° 92' 58.25" N 105° 88' 92.20" O
27	El Rosario	Loma verde	22° 94' 16.67" N 105° 87' 02.78" O
28	El Rosario	Higueras-lado izquierdo	23° 05' 33.33" N 105° 95' 58.33" O

29	El Rosario	Km236 lado der Rosario-Mazatlán	23° 05' 78.01" N 105° 97' 04.83" O
30	El Rosario	km252 carretera Rosario-Mazatlán	23° 15' 62.41" N 106° 07' 73.65" O
31	Escuinapa	Frente a Hospital general	22° 78' 46.90" N 105° 85' 17.10" O
32	Escuinapa	Esquina a Ecofrut-tabachin	22° 84' 68.87" N 105° 80' 11.09" O
33	Escuinapa	La Loma	22° 51' 41.67" N 105° 46' 58.63" O
34	Escuinapa	Frente a policia estatal	22° 82' 60.60" N 105° 77' 56.49" O
35	Escuinapa	Pueblo Nuevo	22° 84' 27.42" N 105° 78' 38.28" O
36	Escuinapa	Malecón	22° 51' 10.44" N 105° 46' 41.33" O
37	Escuinapa	Antes de Rincon del verde	22° 89' 83.33" N 105° 80' 88.89" O
38	Escuinapa	Infonavit Arroyo Seco	22° 84' 36.70" N 105° 77' 31.70" O
39	Escuinapa	Salida de Escuinapa-Nayarit	22° 54' 34.52" N 105° 51' 78.78" O
40	Escuinapa	Tecualilla	22° 76' 66.67" N 105° 67' 16.67" O

7.2. Identificación morfológica de *Fusarium* spp.

De los 168 aislados inoculados en plantas de mango, 80 aislados fueron patogénicos, mismos que se identificaron por especie con base en las características morfológicas, descritas en el cuadro 8 por municipio. Solo la especie *F. neocosmosporiellum* no se logró identificar morfológicamente.

Cuadro 8. Identificación morfológica de aislados patogénicos de *Fusarium* spp. por municipio.

Municipio	Especies de <i>Fusarium</i>					
	<i>decemcellulare</i>	<i>solani</i>	<i>pseudocircinatum</i>	<i>incarnatum</i>	<i>proliferatum</i>	<i>neocosmosporiellum</i>
Ahome	13	3	2	0	1	0
Culiacán	4	1	1	3	0	0
Navolato	1	0	0	2	0	0
El Rosario	21	0	5	5	1	2
Escuinapa	10	0	3	2	0	0
Total	49	4	11	12	2	2

7.2.1. *Fusarium decemcellulare*

Los aislados de *F. decemcellulare* en medio PDA mostraron un micelio algodonoso de coloración blanco a crema, conforme pasa el tiempo se puede oscurecer dando un tono rojo-rosa en las orillas. Las microconidias (n=50) fueron ovaladas y sin septos, por lo general en cadenas largas, midieron 16.1-32.4 x 5.1-6.9 µm. Las macroconidias (n=50) eran largas, grandes y de paredes gruesas con

curvatura uniforme en ambos lados y midieron 104.1-172.8 x 9.6-19.1 μm , tienen de 5 a 9 septos. No se observaron clamidosporas (Figura 20).

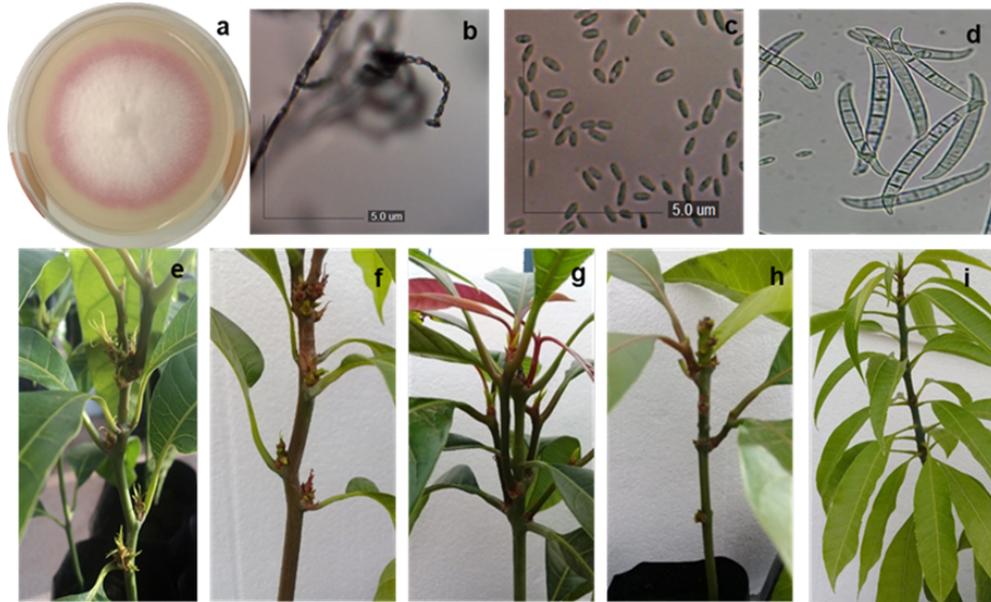


Figura 20. Características morfológicas de *Fusarium decemcellulare*. a) Cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias (5 μm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).

7.2.2. *Fusarium proliferatum*

Los aislados de *F. proliferatum* en medio PDA presentaron micelio algodonoso con una coloración inicial de blanco y pasando el tiempo a color violeta. Las microconidias (n=50) fueron piriformes y sin septos, midieron de 8.1-10.6 x 5.1-6.9 μm . Las macroconidias (n=50) fueron delgadas, curvadas y finas, de 4 a 5 septos y midieron de 39.5-76.8 x 5.7-9.5 μm . Se observaron clamidosporas intercaladas (Figura 21).

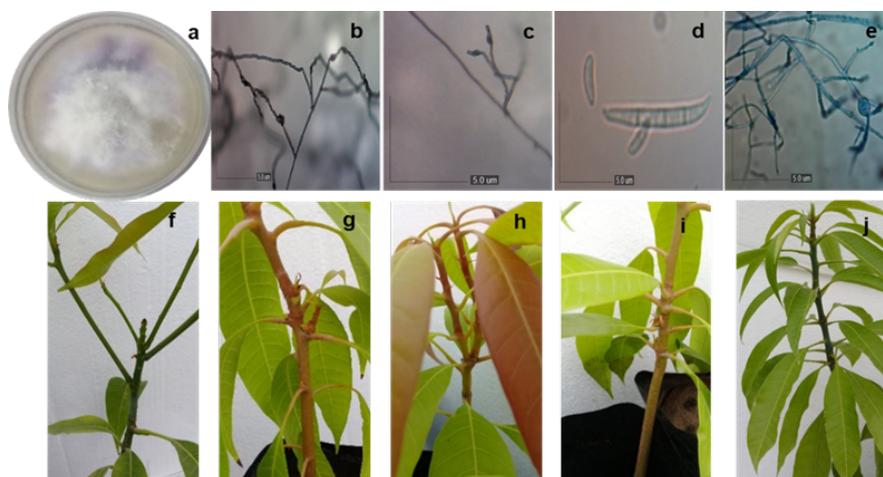


Figura 21. Características morfológicas de *Fusarium proliferatum*. a) Cultivo monospórico en medio PDA, b) y c) fiálides, d) microconidias y macroconidias, e) clamidospora intercalada en medio de cultivo CLA (5 μm bar), f-i) síntomas de malformación, j) planta sana (testigo).

7.2.3. *Fusarium pseudocircinatum*

Los aislados de *F. pseudocircinatum* en medio PDA presentaron micelio algodonoso que fluctuó de color blanco a violeta. Las microconidias (n=50) se observaron de forma oval a ovoide, de 0-1 septos, midieron de 12.1-30.1 x 3.3-10.5 μm . Las macroconidias (n=50) fueron delgadas, ligeramente falcadas y de paredes gruesas, predominando las de 3 septos y midieron de 50.5-128.8 x 4.6-7.2 μm . Las clamidosporas no se observaron (Figura 22).

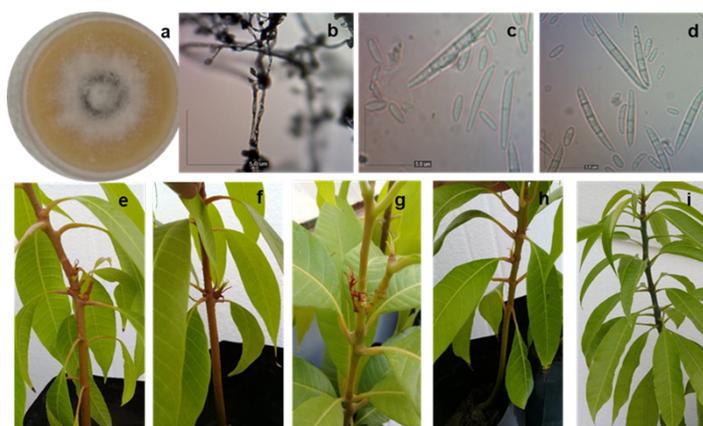


Figura 22. Características morfológicas de *Fusarium pseudocircinatum*. a) Cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias en

medio de cultivo CLA (5 μm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).

7.2.4. *Fusarium solani*

Los aislados de *F. solani* en medio PDA mostraron micelio algodonoso con una coloración blanca a violeta. Las microconidias (n=50) fueron ovales, elipsoides, reniformes y fusiformes, de 0-1 septos y midieron 12.3-29.5 x 3.5-9.3 μm . Las macroconidias (n=50) fueron subcilíndricas ligeramente curvadas y de paredes gruesas, de 5-7 septos y midieron 39.9-101.3 x 4.9-12.8 μm . Se observaron esporodoquios de color café. No se observaron clamidosporas (Figura 23).

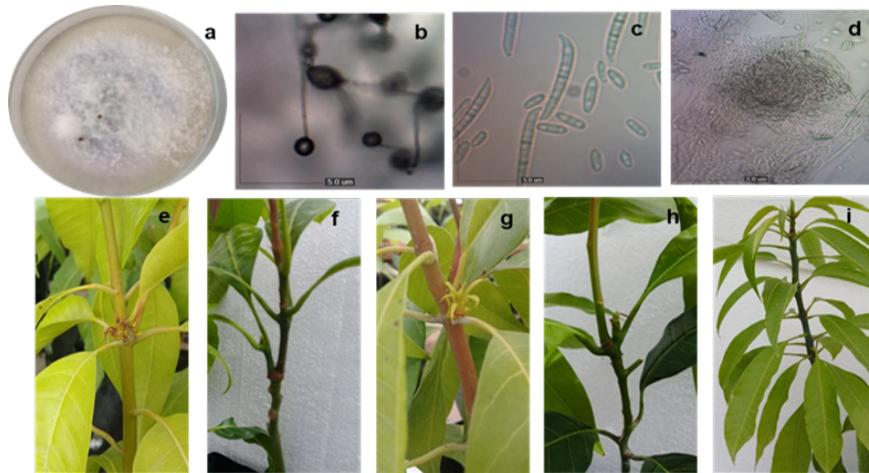


Figura 23. Características morfológicas de *Fusarium solani*. a) Cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias y macroconidias, d) esporodoquios en medio de cultivo CLA (5 μm bar), e-h) síntomas de malformación, i) planta sana (testigo).

7.2.5. *Fusarium incarnatum*

Los aislados de *F. incarnatum* en medio PDA mostraron un micelio algodonoso de coloración blanco a café, con el tiempo se tornaron café oscuro. Las microconidias (n=50) eran piriformes, de 0 -1 septos, midiendo 7.4-30.9 x 3.8-8.3 μm . Las macroconidias (n=50) eran relativamente esbeltas con una curva, de 3 a 5 septos, midiendo 41.4-92.7 x 4.2-10.1 μm . Se observaron clamidosporas intercaladas en cadena y esporodoquios (Figura 24).

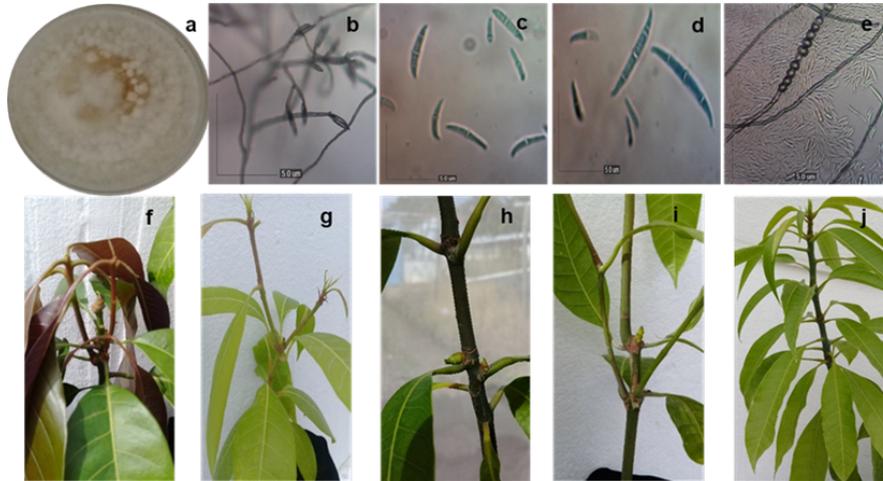


Figura 24. Características morfológicas de *Fusarium incarnatum*. a) Cultivo monospórico en medio PDA, b) fiálides, c) microconidias, d) macroconidias, e) esporodoquio y clamidosporas en forma de cadena en medio de cultivo CLA (5 μm bar), f-i) síntomas de malformación, j) planta sana (testigo).

7.2.6. *Fusarium neocosmosporiellum*

Los aislados de *F. neocosmosporiellum* en medio PDA presentaron micelio algodonoso (en el centro) de color blanco y café alrededor, con bordes irregulares. Las microconidias (n=30) fueron cilíndricas a elipsoidales oblongas y hialinas, con 0-1 septos de 4.2-17.3 x 2.3-7.9 μm . Las macroconidias (n=20) fueron hialinas, con frecuencia casi rectas y más anchas en el medio, de 3 a 4 septos de 41.1-75.7 x 4.9-11.1 μm . Se observó la fase (teleomorfo) del hongo *Neocosmospora vasinfecta*, los peritecios (n=20) fueron de coloración naranja a rojo, periformes, con cuello corto, 185.3-294.6 x 126.4-220.7 μm . Los ascos (n=30) cilíndricos con ocho ascosporas y un pedicelo corto midiendo 78.3-89 x 6.5-8.8 μm . Las ascosporas (n=50) globosas, cilíndricas, unicelulares y de paredes rugosas de 12.9-29.8 x 11.7-26.5 μm . (Figura 25).

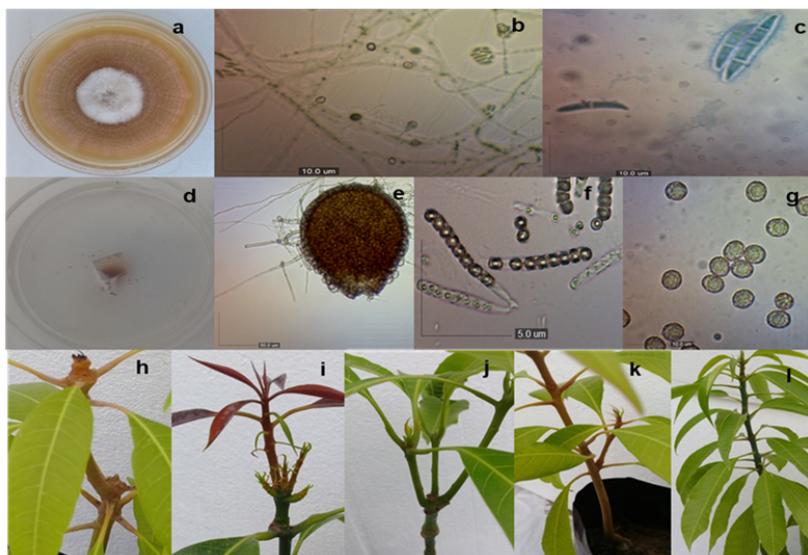


Figura 25. a-c). Características morfológicas de *Fusarium neocosmosporiellum* y d-g) *Neocosmospora vasinfecta*; a) cultivo monospórico en PDA, b) microconidias, c) macroconidias (10 µm bar), d) exudación de peritecios, e) peritecios (50 µm bar) f) ascos con ochos ascosporas unilaterales (5 µm bar), g) ascosporas con pared ornamentada (10 µm bar), h-k) síntomas de malformación, l) planta sana (testigo).

7.3. Identificación molecular de *Fusarium* spp.

El resultado de los análisis de PCR de los aislados de *Fusarium* spp. mostró la amplificación del tamaño de fragmento esperado para el gen TEF-1α (Figura 26).

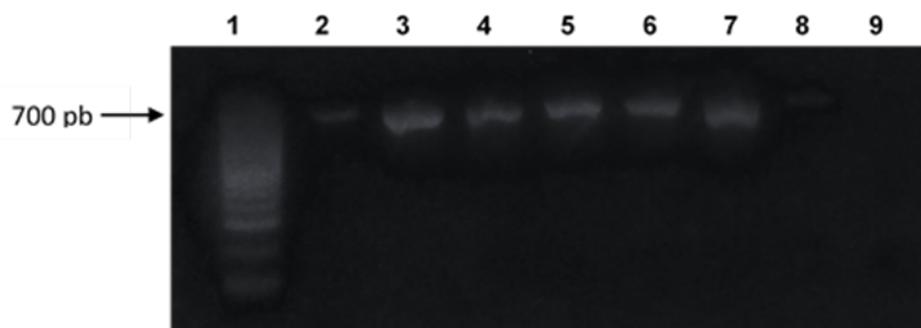


Figura 26. Producto amplificado de PCR de *Fusarium* spp. Carril 1 marcador de tamaño molecular Hypper Lader IV; carriles 2-8 aislados seleccionados (20FASIN, 128FRSIN, 66VRSIN, 111VRSIN, 163VCSIN, 6 VASIN y 13FASIN); carril 9 control negativo (sin ADN).

En el análisis del tipo de apareamiento, los 25 aislados de *Fusarium* (21 *F. decemcellulare*, 1 *F. solani*, 1 *F. proliferatum* y 1 *F. neocosmosporielum*), amplificaron para MAT-2.

Una vez obtenidas las secuencias de los aislados se compararon en las bases de datos del GenBank (NCBI), Fusarium-ID y Fusarium MLST. Lo cual da la seguridad y se confirmó el reconocimiento de especies que habían sido identificadas mediante la morfología. Posterior a ello, se registraron las secuencias en el GenBank. En el cuadro 9 se muestran las especies de *Fusarium*, aislado, origen del aislado y el número de accesión proporcionado por el GenBank.

El aislado de *F. solani* MK932787 tuvo un 99.26 % de similitud con las secuencias MICMW-30.1 que fue aislada de la caoba de hoja grande en México y CSM_142 aislada de coffee cherries en Venezuela con los números de accesión KX870044 y MG049926 respectivamente.

F. neocosmosporiellum con el aislado MK932796 presentó un 99.40 % y 99.10 % de similitud con las secuencias con número de accesión AF178349 y AY381145 respectivamente.

El aislado de *F. proliferatum* MK932806 obtuvo un 99.84 % con la secuencia que fue aislada de banana en Indonesia y CA-1 aislada de *Cannabis sativa* con los números de accesión MH535857 y MN784814 respectivamente.

Las secuencias que pertenecen a *F. pseudocircinatum* MK932788, MK932789, MK932801, MK932803 y MK932817 presentaron un 100 % de similitud con la secuencia QTDY2 aislada de *Dracaena trifasciata* en Malaysia y MICMW-26.16 aislada de la caoba de hoja grande en México, con los números de accesión MN386745 y KX870035 respectivamente.

Los ocho aislamientos de *F. incarnatum* MK932792, MK932800, MK932804, MK932807, MK932811, MK932812, MK932813 y MK932814 en general presentaron un 99.69 % de similitud con las secuencias JSDF.i.1901 aislada de pepino y JLML1 aislada de *Toxicodendron sylvestri* ambos de China, con los números de accesión MN233577 MH537594 respectivamente.

Los aislados de *F. decemcellulare* MK932781, MK932782, MK932783, MK932784, MK932785, MK932786, MK932790, MK932791, MK932793, MK932794,

MK932795, MK932797, MK932798, MK932799, MK932802, MK932805, MK932808, MK932809, MK932810, MK932815 y MK932816 en general presentaron un 99.69 % de similitud con las secuencias F47, F46 que fueron aisladas del árbol de caucho en Brasil con número de accesión MK482327 y MK482326 respectivamente, seguido de un 99.54 % de similitud con la secuencia aislada de mango en República Dominicana EEFB1 con número de accesión KX345392.

Cuadro 9. Especies de *Fusarium*, aislados, variedad y tipo de muestra, origen y número de accesión del GenBank.

Especies	Aislados	Variedad-muestra	Origen	GenBank # accesión
<i>F. solani</i>	20FASIN	Kent-floral	Sinaloa, Ahome	MK932787
<i>F. neocosmosporiellum</i>	66VRSIN	Kent-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932796
<i>F. proliferatum</i>	128FRSIN	Kent-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932806
<i>F. pseudocircinatum</i>	23FRSIN	Kent-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932788
<i>F. pseudocircinatum</i>	26FRSIN	Kent-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932789
<i>F. pseudocircinatum</i>	103FESIN	Keitt-floral	Sinaloa, Escuinapa	MK932801
<i>F. pseudocircinatum</i>	111VRSIN	Tailandes-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932803
<i>F. pseudocircinatum</i>	182VCSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Culiacán	MK932817
<i>F. incarnatum</i>	39VRSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932792
<i>F. incarnatum</i>	95VESIN	Tommy-vegetal	Sinaloa, Escuinapa	MK932800
<i>F. incarnatum</i>	121FRSIN	Tommy-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932804
<i>F. incarnatum</i>	134VRSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932807
<i>F. incarnatum</i>	161VCSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Culiacán	MK932811
<i>F. incarnatum</i>	163VCSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Culiacán	MK932812
<i>F. incarnatum</i>	166VCSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Culiacán	MK932813
<i>F. incarnatum</i>	170FNSIN	Keitt-floral	Sinaloa, Navolato	MK932814
<i>F. decemcellulare</i>	2FASIN	Keitt-floral	Sinaloa, Ahome	MK932781
<i>F. decemcellulare</i>	6VASIN	Kent-vegetal	Sinaloa, Ahome	MK932782
<i>F. decemcellulare</i>	8FASIN	Keitt-floral	Sinaloa, Ahome	MK932783
<i>F. decemcellulare</i>	13FASIN	Ataulfo-floral	Sinaloa, Ahome	MK932784
<i>F. decemcellulare</i>	14FASIN	Ataulfo-floral	Sinaloa, Ahome	MK932785
<i>F. decemcellulare</i>	16VASIN	Ataulfo-vegetal	Sinaloa, Ahome	MK932786
<i>F. decemcellulare</i>	27FRSIN	Keitt-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932790
<i>F. decemcellulare</i>	35FRSIN	Kent-floral	Sinaloa, El Rosario	MK932791

<i>F. decemcellulare</i>	42VRSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932793
<i>F. decemcellulare</i>	58VRSIN	Kent-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932794
<i>F. decemcellulare</i>	63VRSIN	Tommy-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932795
<i>F. decemcellulare</i>	74VESIN	Kent-vegetal	Sinaloa, Escuinapa	MK932797
<i>F. decemcellulare</i>	88FESIN	Keitt-floral	Sinaloa, Escuinapa	MK932798
<i>F. decemcellulare</i>	94VESIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Escuinapa	MK932799
<i>F. decemcellulare</i>	107VESIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, Escuinapa	MK932802
<i>F. decemcellulare</i>	124VRSIN	Tommy-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932805
<i>F. decemcellulare</i>	141VRSIN	Keitt-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932808
<i>F. decemcellulare</i>	147VRSIN	Kent-vegetal	Sinaloa, El Rosario	MK932809
<i>F. decemcellulare</i>	150VESIN	Tommy-vegetal	Sinaloa, Escuinapa	MK932810
<i>F. decemcellulare</i>	175VNSIN	Kent-vegetal	Sinaloa, Navolato	MK932815
<i>F. decemcellulare</i>	181VCSIN	Kent-vegetal	Sinaloa, Culiacán	MK932816

7.4. Análisis filogenéticos

El filograma que resultó del análisis de las secuencias del gen TEF-1 α con el método de unión de vecinos (Neighbor-Joining) mostró de forma clara 6 clados con valores altos de similitud mostrados en las ramas, alineando cada especie de *Fusarium* en clados diferentes. El primer clado incluyó cepas de *F. incarnatum* de diferentes huéspedes y de diferentes regiones geográficas, las secuencias del presente estudio (en negrita) se agruparon estrechamente con secuencias aisladas de Chile (Trinidad y Tobago) y melón chino (India) con los números de accesoión KT313002 y HE995535 respectivamente. El segundo clado está formado por secuencias de *F. proliferatum* de diferentes regiones geográficas y diferentes huéspedes. La secuencia del presente estudio se agrupó estrechamente con la secuencia aislada de mango (Australia) con el número de accesoión KX452384. El tercer clado incluye a secuencias de *F. pseudocircinatum* de diferentes hospedantes y diferentes países, las secuencias en estudio se agruparon con secuencias aisladas de vainilla (Indonesia) y banana (USA) con los números de accesoión GQ425230 y GU377298 respectivamente. El cuarto clado comprendió secuencias de *F. neocosmosporiellum*, la secuencia en el presente estudio se agrupó estrechamente con la secuencia aislada de maní (Guinea) con el número de accesoión AF178349.

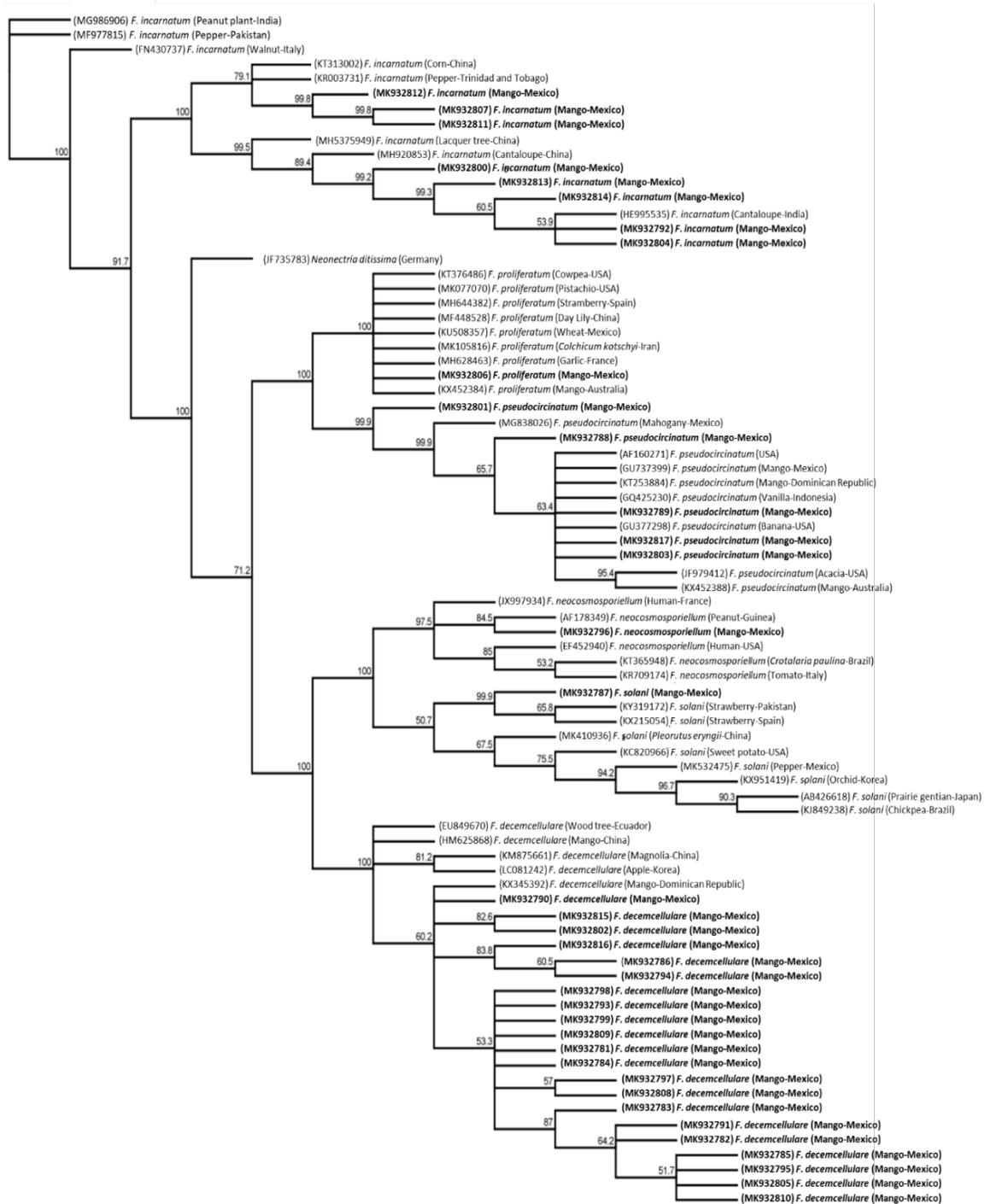


Figura 27. Filograma con el método de Neighbor-Joining para el gen TEF-1 α de *F. incarnatum*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. neocosmosporiellum*, *F. solani* y *F. decemcellulare*. Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 réplicas). Como grupo externo a *Neonectria ditissima* (JF735783). Las secuencias del presente estudio se observan en negrita.

En el quinto clado se agruparon secuencias de *F. solani*, la secuencia en estudio se agrupó estrechamente con las secuencias de los aislados de fresa de (Pakistan y España) con los números de accesión KY319172 y KX215054 respectivamente. El sexto clado fue el más grande y se formó con secuencias de *F. decemcellulare*, las 21 secuencias en estudio se agruparon estrechamente con la secuencia aislada de mango (República Dominicana) con el número de accesión KX345392. Como grupo externo se estableció a *Neonectria ditissima* (JF735783) (Figura 27).

7.5. Ensayo de patogenicidad en plantas de mango

Las plántulas de mango mostraron síntomas como hinchazón, múltiples brotes laterales y apicales, entrenudos acortados, hojas pequeñas escamosas y ápice bunchy. Los primeros síntomas se observaron a partir de las cuatro semanas después de la inoculación, se evaluaron cada semana hasta los doce meses después de la inoculación. Se re-aislaron las cepas que resultaron patogénicas y se identificaron nuevamente, comprobando que la cepa que se inoculó fue la causante de los síntomas de la enfermedad, así se cumplió con los postulados de Koch.

En lo que respecta a *F. solani* ha sido descrito como agente causal de la pudrición de raíz en garbanzo en Brasil por Cabral *et al.* (2016) y la marchitez en plantas maduras de chile poblano y damping-off en plántulas en México por Rivera-Jiménez *et al.* (2018).

Se ha reportado a la fase (teleomorfo) de *F. neocosmosporiellum* que corresponde a *Neocosmospora vasinfecta* como primer informe causando la pudrición de la raíz en garbanzo en Pakistán (Ali *et al.*, 2011). Frederick *et al.* (2013) en su estudio encontraron a *Neocosmospora vasinfecta* como agente causal de infección diseminada (ulceras en abdomen, piernas y cráneo) en un paciente con leucemia aguda linfoblástica B en Francia e identificado mediante caracterización molecular. *Neocosmospora vasinfecta* var. *vasinfecta* se reportó como primer informe causando la pudrición del tallo de la soja en Corea del Sur (Sun *et al.*, 2014).

F. proliferatum fue identificado como agente causal de la malformación del mango en el Sur de China por Zhan *et al.* (2010) quienes encontraron cinco aislados patogénicos con una incidencia del 10 al 70 % de la enfermedad.

A su vez fue señalado como causante de la malformación a *F. decemcellulare* en Venezuela por Castellano y Guanipa (2004) en su estudio inocularon de manera artificial 10 cultivares de mango, todos formaron agallas no solo en el punto de inoculación, sino en lo entrenudos también. Sosa *et al.* (2016) informaron que *F. decemcellulare* causa agallas en cojín en plántulas de cacao, a los 45 días después de la inoculación.

En México se registró el primer informe de *F. pseudocircinatum* por Freeman *et al.* (2014), como agente causal de la malformación, las plantas inoculadas presentaron síntomas típicos de la malformación vegetal a los 9 meses después de la inoculación en un 13 al 86 % de los brotes inoculados. Posteriormente se identificó en República Dominicana por García-López *et al.* (2016), ellos señalan que todas las plantas inoculadas mostraron síntomas vegetativos a los 11 meses después de la inoculación.

Fusarium incarnatum fue reportado por Gai *et al.* (2016) como agente causal de la podredumbre del tallo del maíz en China.

Los aislados que resultaron patogénicos variaron en el grado de virulencia de acuerdo con los síntomas de la enfermedad. Los aislados más agresivos fueron 13FASIN y 5FASIN (*F. decemcellulare*) causando un índice de severidad de la enfermedad de 44 %. Sin embargo, solo fueron estadísticamente diferentes del control y de los aislados menos agresivos 170FNSIN, 174VNSIN (*F. incarnatum*), 101VESIN, 27FRSIN, 88FESIN, 107VESIN, 36VRSIN y 150VESIN (*F. decemcellulare*) con un índice de severidad de la enfermedad (8 y 4 %) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de rangos por Dunn ($p \leq 0.05$)

Aislado ^a	Suma de rangos ^b	Media de rangos ^b	DSI % ^c	Grupos*
5FASIN	2770.5	461.75	44	A
6VASIN	2742	457	40	AB
16VASIN	2681.5	446.917	40	ABC
18FASIN	2672	445.333	40	ABC
8FASIN	2482.5	413.75	40	ABCD
115FRSIN	2431.5	405.25	28	ABCD
1FASIN	2406.5	401.083	28	ABCD

12VASIN	2340.5	390.083	28	ABCD
145FRSIN	2218	369.667	28	ABCDE
133FRSIN	2201	366.833	28	ABCDE
4VASIN	2172	362	24	ABCDE
124VRSIN	2145	357.5	24	ABCDE
163VCSIN	2087.5	347.917	24	ABCDE
120VRSIN	2020.5	336.75	24	ABCDE
166VCSIN	2000.5	333.417	24	ABCDE
184VCSIN	1991.5	331.917	24	ABCDE
181VCSIN	1987	331.167	24	ABCDE
111VRSIN	1978	329.667	24	ABCDE
2FASIN	1969	328.167	24	ABCDE
130VRSIN	1933.5	322.25	24	ABCDE
17FASIN	1917	319.5	24	ABCDE
141VRSIN	1792.5	298.75	24	ABCDE
128FRSIN	1759	293.167	24	ABCDE
15VASIN	1745.5	290.917	24	ABCDE
140FRSIN	1732	288.667	24	ABCDE
26FRSIN	1690.5	281.75	24	ABCDE
66VRSIN	1687	281.167	24	ABCDE
22VASIN	1682	280.333	24	ABCDE
39VRSIN	1586.5	264.417	24	ABCDE
121FRSIN	1564.5	260.75	24	ABCDE
3VASIN	1546.5	257.75	24	ABCDE
134VRSIN	1523.5	253.917	24	ABCDE
182VCSIN	1516	252.667	24	ABCDE
139VRSIN	1514	252.333	24	ABCDE
63VRSIN	1496.5	249.417	24	ABCDE
40VRSIN	1486	247.667	24	ABCDE
179VCSIN	1441	240.167	20	ABCDE
183FCSIN	1403.5	233.917	20	ABCDE
161VCSIN	1398	233	20	ABCDE
69VRSIN	1387	231.167	20	ABCDE
20FASIN	1351	225.167	20	ABCDE
21VASIN	1345	224.167	20	ABCDE
90VESIN	1344	224	20	ABCDE
35FRSIN	1322	220.333	20	ABCDE
127VRSIN	1304.5	217.417	20	ABCDE
94VESIN	1285.5	214.25	20	ABCDE
165FCSIN	1251	208.5	16	ABCDE
7FASIN	1250	208.333	16	ABCDE
131VRSIN	1232.5	205.417	16	ABCDE
29VRSIN	1219.5	203.25	16	ABCDE

68VRSIN	1208.5	201.417	16	ABCDE
54VRSIN	1202.5	200.417	16	ABCDE
38FRSIN	1188	198	16	ABCDE
11VASIN	1163	193.833	16	ABCDE
175VNSIN	1160	193.333	16	ABCDE
106FESIN	1149	191.5	16	ABCDE
14FASIN	1130.5	188.417	16	ABCDE
89VESIN	1120	186.667	16	ABCDE
143VRSIN	1096.5	182.75	12	ABCDE
103FESIN	1072.5	178.75	12	ABCDE
95VESIN	1071.5	178.583	12	ABCDE
122VRSIN	1021	170.167	12	ABCDE
144VRSIN	988	164.667	12	ABCDE
74VESIN	975	162.5	12	ABCDE
42VRSIN	975	162.5	12	ABCDE
23FRSIN	835.5	139.25	12	ABCDE
147VRSIN	799	133.167	12	ABCDE
58VRSIN	791	131.833	12	ABCDE
80VESIN	775.5	129.25	12	ABCDE
25VRSIN	762.5	127.083	12	ABCDE
41FRSIN	760	126.667	12	ABCDE
170FNSIN	649.5	108.25	8	BCDE
101VESIN	627.5	104.583	8	CDE
27FRSIN	554.5	92.417	8	DE
88FESIN	506.5	84.417	8	DE
174VNSIN	499.5	83.25	4	DE
107VESIN	490	81.667	4	DE
36VRSIN	435.5	72.583	4	DE
150VESIN	407	67.833	4	DE
Control	123	20.5	0	E

*Las letras iguales no muestran diferencia significativa.

^a Aislamientos monospóricos de *Fusarium* spp.

^b Comparación de rangos de Dunn con $p \leq 0.05$.

^c Índice de severidad de la enfermedad expresado en porcentaje.

Esta es la principal enfermedad que afecta este cultivo en la región centro occidente de México (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). La ausencia de regulaciones sanitarias en el tránsito de material vegetativo de viveros de mango a regiones distintas de un país podría contribuir a diseminar a este patógeno (Zheng y Ploetz, 2002).

7.6. Determinación *in vitro* de la sensibilidad de los aislados de *Fusarium spp.* a fungicidas comerciales

El fungicida Carbenpro indujo el menor crecimiento micelial (23.29 %) con la dosis de 1000 ppm, observándose el mayor efecto en la inhibición de las especies de *Fusarium* con 76.71 %, respecto al resto de los fungicidas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium spp.* bajo diferentes dosis de fungicida.

Concentración (ppm)	Fungicidas					
	Dithane	Trenavil	Carbenpro	Cercobin M	Naria Top	Cabrio C
1	83.21 a	58.53 a	41.09 a	75.44 a	62.12 a	69.82 a
10	72.17 ab	53.51 ab	36.48 a	72.31 ab	56.21 a	53.97 a
100	50.81 bc	47.47 ab	29.34 a	37.35 bc	54.44 a	50.8 ab
1000	30.63 c	41.22 b	23.29 a	32.22 c	44.92 a	36.41 b

*Letras iguales no muestran diferencia significativa

Alburqueque y Gusqui (2018) observaron inhibición del 100 % en crecimiento del micelio de *F. oxysporum* con la aplicación de Carbendazim (Carbenpro) a una concentración de 200 cc/cilindro. De acuerdo a FRAC (2017), el fungicida Carbendazim inhibe el ensamble de la Beta-tubulina en la mitosis. Además, inhibe la formación del apresorio, el crecimiento y desarrollo del micelio de los patógenos (Silvestre, 2017). Carbendazim y otros bezimidazoles poseen alta eficacia para controlar especies de *Fusarium* en diferentes cultivos (Deepak y Lal, 2009).

VIII. CONCLUSIONES

Se determinó que seis especies de *Fusarium* (*F. decemcellulare*, *F. solani*, *F. pseudocircinatum*, *F. incarnatum*, *F. proliferatum* y *F. neocosmosporiellum*) causaron la malformación del mango en Sinaloa,

Se obtuvo el primer informe donde se señala que las especies *F. solani*, *F. neocosmosporiellum* y *F. incarnatum* son agentes causales de la malformación del mango a nivel mundial.

F. proliferatum y *F. decemcellulare* se reportaron por primera vez a nivel nacional.

El 47.67 % de los aislados inoculados en plántulas de mango, fueron patogénicos. Los aislados que fueron patogénicos variaron en el grado de virulencia de acuerdo con la escala de severidad de la enfermedad, observándose que *Fusarium decemcellulare* (13FASIN y 5FASIN) provocó el mayor índice de severidad (44 %) de la enfermedad.

Se identificaron 37 aislados que incluyen las seis especies de *Fusarium*, por técnicas moleculares, y las secuencias de los aislados se registraron en el GenBank.

En el análisis del tipo de apareamiento, los 25 aislados de *Fusarium* (21 *F. decemcellulare*, 1 *F. solani*, 1 *F. proliferatum* y 1 *F. neocosmosporielum*), amplificaron sólo para MAT-2, sugiriendo una reproducción asexual.

El filograma obtenido con las secuencias en el presente estudio se agruparon en seis grupos por especies, con secuencias ya registradas en el GenBank.

Los aislados patogénicos mostraron sensibilidad a todos los fungicidas evaluados, sin embargo, no se alcanzó el 100 % de inhibición en ninguna de las dosis evaluadas.

La malformación del mango es una enfermedad causada por al menos 10 especies del género *Fusarium*, por lo cual, es de suma importancia investigar los mecanismos de infección, biología, diseminación y patogénesis, así diseñar estrategias de control.

IX. LITERATURA CITADA

- Addinsoft. 2020. XLSTAT Software. Version 2018. 451393. Addinsoft 1995-2018.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth Ed. Academic Press, Burlington. 635p.
- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D. y Brunelli, A. 2005. Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of italian pear orchards. Eur. J. Plant Pathol. 113: 211-219.
- Alburquerque, A. D. y Gusqui, M. R. 2018. Effectiveness of Chemical Fungicides for *in vitro* Control of Different Phytopathogens in Controlled Conditions. Arnaldoa. 25 (2): 489-498. doi: 10.22497/arnaldoa.252.25209
- Almeida, F. A., Araújo, E., Goncalves, J., Hermes, G. J., Barreto, A. F. y Carvalho, R. A. G. 2003. Diagnóstico e quantificação de doenças fúngicas da acerola no Estado da Paraíba. Fitopatol. Bras. 28 (2): 176-179. doi: 10.1590/S0100-41582003000200010
- Altschulf, S. F., Gish, W., Miller, W., Miyers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology. 215: 403-410.
- American Phytopathology Society (APS). 2015. www.apsnet.org/online/communitsearch/asp. (Consulta marzo 2016).
- Angulo, S. M. y Villapudua, J. R. 1982. Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in state of Sinaloa, Mexico. Phytopathology. 72:171.
- Arias, B. y Carrizales, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado Monagas, Venezuela. Bioagro. 19 (1): 19-25.
- Arista, C. 2017. Fungitox. Consultado el 12 Dic 2017. Disponible en: [http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITOX%20\(vr.%202\).pdf](http://www.arysta.com.co/ProductosProteccion/PDF/F.T.%20FUNGITOX%20(vr.%202).pdf)
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Scidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. 2003. Current protocols in molecular biology. Wiley, New York: 4648 p.
- Avenot, H. F. y Michailides, T. J. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. Plant Dis. 91:1345-1350.

- Ayoubi, N. y Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. *Sydowia*. 68: 163–171.
- Betancourt, R. I., Velázquez, M. J. J., Montero, C. J. C., Fernández, P. S. P., Lozoya, S. H. y Rodríguez, A. G. 2012. *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30:115-127.
- Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. y Wingfield, M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia*. 94 (4): 722-730.
- Brody, J. R. y Scott, E. K. 2004. Sodium boric acid: A tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. 36 (2): 214-216.
- Cabral, C. S., Melo, M. P., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S. y Reis, A. 2016. A root rot of chickpea caused by isolates of the *Fusarium solani* species complex in Brazil. *Plant Disease*. 100 (10): 2171-2171
- Calaca, F. J. S., Silva, N. C., Hirooka, Y. y Xavier-Santos, S. 2013. *Neocosmospora vasinfecta* (Nectriaceae) un nuevo récord como Ascomycota fimicolous de Brasil. *Mycosphere*. 4 (5): 999-1004. doi: 10.5943 / mycosphere / 4/5/13
- Castellano, G. y Guanipa, N. 2004. Comportamiento de diez cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la inoculación con *Fusarium decemcellulare* Brix. *Revista de Facultad de Agronomía*. 21, 200-206.
- Chakrabarti, D. K. 2011. Mango malformation. Germany, Springer. 148 p.
- Chakraborty, M. R. y Chatterjee, N. C. 2008. Control of fusarium wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biol Plant*. 52: 582–586. doi: 10.1007/s10535-008-0116-2
- 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 Núm. 1. Campo Experimental Valle de Apatzingán. CIRPAC. INIFAP. Agosto. Michoacán, México.
- Cho, S. W., Mitchell, A., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., Friedlander, T. P. y Zhao S. W. 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level

- phylogenetics-Elongation-Factor-1-Alpha recovers morphology-based tree for Heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 650-656.
- Coddington, A. y Gould, D. S. 1992. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. *In: Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens*. J. M. Duncan & L. Torrance, eds. British Society for Plant Pathology. Blackwell Science Publications, Oxford, Gran Bretaña: 162-176.
- Conde-Ferrález, L. 2007. El *locus mat* (*mating-type*) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 95–99.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. y Picard, M. 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61: 411-428.
- Deepak, B. y Lal, G. 2009. Integrated strategy to control wilt disease of cumin (*Cuminum cyminum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* (Schlecht) Prasad. y Patel. *J. Spices and Aromatic Crops* 18 (1): 13-18.
- Dingra, D. y Sinclair, J. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. Editorial CRC Press. ISBN 10: 084935921. 448 p.
- Eguiarte, L. E. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de las familias Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 45-56
- Fingstag, M. D., Casa, R. T., Bogo, A., Kuhnem, P., Sangoi, L., Valente, J. B., Bevilaqua, D., Fiorentin, O. A. y Gonçalves, M. J. 2019. Fungicide performance on *Fusarium meridionale* control, grain yield and grain damage in maize. *Summa Phytopathologica*. 45 (3): 65-271.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). 2021. Datos de alimentación y agricultura. www.fao.org/faostat/en/#data/QC (Consulta, abril 2021).
- Freeman, S., Maimon, M., y Pinkas, Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. *Phytopathology*. 89 (6): 456-461.

- Freeman, S., Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M. R., Ploetz, R. C., Aoki, T. y O'Donnell K. 2014. First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Disease*. 98 (11): 1583.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2017. List of Fungicide Common Names. Consultado el 01 Dic. 2017. Disponible en: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf>
- Galanihe, L. D., Priyantha, M. G. D. L., Yapa, D. R., Bandara, H. M. S., y Ranasinghe, J. A. 2004. Insect pest and diseases incidences of exotic hybrid Chilli pepper varieties grown in the low Country dry zone of Sri Lanka. *Annals of Sri Lanka*. 6: 99-106.
- Galán-Saúco, V. 2009. *El cultivo del mango*. 2º Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Gamliel-Atinsky, E., Szejnberg, A., Maymon, M., Vintal, H., Shtienberg, D. y Freeman, S. 2009 Infection dynamics of *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. *Phytopathology*. 99 (6): 775-781.
- García, M. S., y Ruíz, M. G. 2005. Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica*. 24 (1): 4-11.
- García-López, E., Mora-Aguilera, J. A. y Nava-Díaz, C. 2016. First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. *Plant Disease*. 100: 1501.
- Geiser, D. G., Lewis-Ivey, M. L., Hazika, G., Juba, J. H. y Miller, S. A. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unidentified member of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 97: 191-201.
- Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K. y Brandt, M. E. 2013. LETTER TO THE EDITOR: One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*. 103: 400–408.
- Geiser, D., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A. y O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID

- v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology. USA. 110: 473–479.
- Ghosal, S., Chakrabarti, D. K., Biswas, K. y Kumar, Y. 1979. Sustancias tóxicas producidas por *Fusarium*. X. Sobre la enfermedad de las malformaciones del mango. *Experientia*. 35: 1633-1634.
- Gil, V. L. F., Arcila, C. A. M., Achury, M. R. A., Sanabria, B. M. C., Arias, B. H. y Baquero, L. K. Y. 2015. Guía de campo para la identificación y manejo de enfermedades y plagas en el cultivo de mango. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.
- González, I., Yailén, A. y Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*- tomate. *Revista de Protección Vegetal*. 27(1): 1-7.
- Groenewald, M., Groenewald, J. Z., Braun, U. y Crous, P. W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. *Mycologia*. (2):275-285.
- Guo, Z., Yu, Z., Li, Q., Tang, L., Guo, T., Huang, S., Mo, J., Hsiang, T., y Luo, S. 2021. *Fusarium* species associated with leaf spots of mango in China. *Microbial Pathogenesis*. 150 1-11. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104736.
- Haggag, W. M., Hazza, M., Sehab, A. y El-Wahab, M. A. 2010. Epidemiology and the association of the *Fusarium* species with the mango malformation disease in Egypt. *Nature Sc*. 8:128-135.
- Hansen, H. N. y Smith R. E. 1932. The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 37 (4): 369-371.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P. y Cunningham, C. W. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*. 264: 671-677.
- Huete, M. y Arias, S. 2007. Manual para la Producción de Mango. USAID-RED. Proyecto de Diversificación Económica Rural.
- Iqbal, Z., Pervez, M. A., Ahmad, S., Iftikhar, Y., Yasin, M. y Nawaz, A. 2010. Determination of minimum inhibitory concentrations of fungicides against fungus *Fusarium mangiferae*. *Pakistan Journal of Botany*. 42 (5): 3525-3532.

- Iqbal, Z., Rehman, M., Dasti, A. A., Saleem, A. y Zafar, Y. 2006. RAPD analysis of *Fusarium* isolates causing mango malformation disease in Pakistan. *World J. Microbiology and Biotechnology*. 22: 1161-1167. doi: 10.1007/s11274-006-9157-x.
- Jasso, D., Hernandez, C. D., Angulo, S. J. L., Rodríguez, G. R., Villarreal, Q. J. y Lira, S. R. 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*. 25 (2): 111-116.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B. y Gonzáles-Jaén, M.T., 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 562–568.
- Kausar, R., Iram, S., Ahmad, K. S., y Jaffri, S. B. 2021. Molecular characterization of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* phyto-pathogens causing mango maturity malconformation. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 1-19. doi: 10.1080/03235408.2021.1910417
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. y Hornok, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4419-4423.
- Khaskheli, M. I., Pathan, M. A., Jiskani, M. M., Wagan, K. H. y Goswami, S. P. 2008. Survey, intensity and varietal response of mango malformation disease (MMD) in different Mango orchards of Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering and Veterinary Sciences*. 24 (1): 53-56.
- Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell y Environment*. 27 (6): 675-684.
- Kopacki, M. y Wagner, A. 2006. Effect of some fungicides on mycelium growth of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., pathogenic to chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Agron. Res.* 4 (Special issue): 237-240.

- Krishnan, A. G., Nailwal, T. K., Shukla, A. y Pant, R. C. 2009. Mango (*Mangifera indica*. L) malformation an unsolved mystery. *Researcher*. 1 (5): 20-36.
- Kumar, J., Singh, U. S. y Beniwal, S. P. S. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Review of Phytopathology*. 31 (1): 217-232.
- Lamine, S. A., Sharma, K., Lava, K. P. y Banyopadhyay, R. 2012. First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium tuiense* in Senegal Plant Disease. 96 (10): 1582-1582.
- Legiscomex es un Sistema de Inteligencia Comercial para la gestión y análisis del comercio exterior, que permite tomar decisiones en los negocios internacionales (LEGISOMEX). 2014. <https://www.legiscomex.com/>. (Consulta enero 2018).
- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Ltd.
- Lima, C. S., Monteir, J. H. A., Crespo, N. C., Costa, S. S., Leslie, J. F. y Pfenning, L. P. 2009. VCG and AFLP analyses identify the same groups in the casual agents of mango malformation in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 123: 17–26.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M., y Leslie, J. F. 2012. *Fusarium tuiense* sp. nov., un miembro de la *Gibberella fujikuroi* compleja que las causas Malformación en Brasil. *Mycologia*. 104: 1408-1419.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual review of microbiology*. 67: 399-416.
- 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.
- Medentsev, A. G. y Akimenko, V. K. 1992. Mechanism of phytotoxic action of naphthoquinone pigments of the fungus *Fusarium decemcellulare*. *Phytochemistry*. 31: 77- 80.

- Montiel, M. F., Isla, L. H., Morales, S. R. y Moya, X. R. 2010. Efectividad biológica in vitro de varios fungicidas frente a patógenos causantes de pudriciones radicales en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Centro Agrícola*. 37(1),11-15.
- Mora, A. J. A. 2000. Patogénesis y epidemiología de la " Escoba de bruja" *Fusarium subglutinans* (Wollemwed y Reinking) y *F. oxysporum* (Schlecht.) del mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán, México. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. México. 107 p.
- Mora, A. A., Téliz O, D., y Reboucas S, J, A. 2002. Enfermedades del mango. Mango: Manejo y Comercialización. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. pp. 55-171
- Mora-Aguilera, A., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G., SánchezGarcía, P. y Javier-Mercado, J. 2003. Progreso temporal de "Escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:1- 12.
- Mora-Montero, J., Gamboa-Porras, J. y Elizondo-Murillo, R. 2002. Guía para el Cultivo del mango, San José Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 80 p.
- Murray, M. G. y Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8: 4321-4325. (7)
- Nei, M. 1991. Efficiencies of different tree-making methods for molecular data. En: Miyamoto M.M. y Cracraft J. Edrs. *Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Oxford University press, New York. 90-128.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.
- Noriega, C. D. H. 1996. "Escoba de bruja" del mango: etiología, hispatología, epidemiología y manejo integrado. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 72 p.
- Noriega-Cantú, D. H., Téliz, D., Mora-Aguilera, G., Rodríguez-Alcazar, J., Zavaleta-Mejía, E., Otero-Colina, G. y Campbell, C. L. 1999. Epidemiology

- of mango malformation in Guerrero, Mexico, with traditional and integrated management. *Plant Disease*. 83: 223-228.
- Normand, F., Lauri, P. E. y Legave, J. M. 2015. Climate change and its probable effects on mango production and cultivation. *Acta Hort.* doi: 1075:21-31. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1075.1>
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W. y Geiser, D. M. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* and *F. chalmydosporum* species complexes within the United States. *J Clin Microbiol.* 47:3851–3861
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia.* 92:919–938.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. y Ploetz, R. C. 1998. 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.
- Olivas, E. E., y Covarrubias, R. 1979. Identificación del agente causal de la deformación floral y vegetativa del mango en México. *Fruticultura Mexicana.* CONAFRUT no. 1:13-16.
- Omar, N. H., Mohd, M., Nik Mohd Izham, M. N. y Zakaria, L. 2018. Characterization and pathogenicity of *Fusarium* species associated with leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.). *Microbial Pathogenesis.* 114:362-368. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.026.
- Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T. y Freeman, S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology.* 100(11), 1176-1184.
- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., y Belmonte-Vargas, J. R. 2017. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Fusarium* spp. del esparrago a productos biológicos fungicidas. XV

Congreso Internacional/XL Congreso Nacional de Fitopatología. Tuxtla, Gutiérrez, Chiapas, México. Recuperado el 18 de febrero de 2018 de http://www.rmfm.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen352017/VOLUMEN_3_5_SUPLEMENTO_2017.pdf

- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., y Belmonte-Vargas, J. R. 2019. Sensibilidad *in vitro* de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. *Acta Universitaria*. 29. 2339. doi: <http://doi.org/10.15174.au.2019.2339>
- Pernezny, K. y Simone, G. W. 2000. Diseases of Mango (*Mangifera indica* L.). In: Common names of plant diseases. www.apsnet.org/online/common/names/mango.asp
- Pinkas, Y. y Gazit, S. 1992. Mango estrategias de control de la malformación.
- Ploetz, R. C., 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. 2007. Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments. *Plant Disease*. 91:644-663.
- Ploetz, R., Vazquez, A. y Benscher, D. 1996. First report of *Fusarium decemcellulare* as a pathogen of mango in the United States. *Plant Dis*. 80:1207.
- Ploetz, R. C. y Gregory, N. 1993. Malformación del mango en Florida: distribución de *Fusarium subglutinans* en los árboles afectados y las relaciones entre las cepas dentro y entre los diferentes huertos. *Horticultura Acta*. 341, 388 - 394.
- Qi, Y. Q., Pu, J. J., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Qun-Fang Yu, Zhang, H. Q. y Xie Y. X. 2013. First report of dieback of mango caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *J. Phytopathol*. 161: 735-738.
- Ram, S. 1991. Horticultural aspects of mango malformation. *Acta Hort*. 291: 235-252.

- Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F. y Philippe, H. 1999. An Evaluation of Elongation Factor 1-Alpha as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. 16 (2): 218-233.
- Rubio, R. G., Baltodano, S. F., Abanto, C. L., Wilson, K. J. y Muñoz, R. M. 2008. Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai- WP. *Revista Biológica de la Universidad de Trujillo, Perú*. 28 (2), 34-46.
- Rymbai, H. y Rajesh, A. M. 2011. Mango malformation: A review. *Life sciences Leaflets*. 22:1079-1095
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. Jul;4(4):406-25.
- Sambrook, J. y Rusell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Thirth Edition, New York, USA. 2100 p.
- Sandoval-Denis, M. y Crous, P. W. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia*. 43:90–185. doi: 10.3767/persoonia. 43.04
- Sanger, F., Nicklen, S. y Chase, A. R. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (12): 5463-5468.
- Scheel, C. M., Hurst, S. F., Barreiros, G., Akiti, T., Nucci, M. y Balajee, S. A. 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infect Dis*. 13:49. doi: 10.1186/1471-2334-13-49
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Cierre de la producción agrícola por cultivo. <https://nube.siap.gob.mx/cierreaagricola/> (Consulta, mayo 2021).
- Short, D. P., O'Donnell, K., Thrane, U., Nielsen, K. F., Zhang, N., Juba, J. H. y Geiser, D. M. 2013. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet Biol*. 53:59–70. doi:10.1016/j.fgb.2013.01. 004.

- Silvestre. 2017. Ficha Técnica PROTEXIN. Consultado el 18 Nov. 2017. Disponible en: http://www.silvestre.com.pe/site/images/Fichas_Tecnicas/FT_PROTEXIN_500_FW_09.pdf
- Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS). 2017. www.itis.gov/w.itis.gov/ (Consulta diciembre 2018).
- Sosa, D., Parra, D., Noceda, C. y Perez-Martinez, S. 2016. Co-occurrence of pathogenic and not pathogenic *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae* isolates within cushion galls disease of cacao (*Theobroma cacao* L.). Journal of Plant Protection Research. 56. doi:10.1515/jppr-2016-0020.
- Souza, C., Silva, C. y Ferreira, A. 2003. "Sex in fungi: lessons of gen regulation". Genetic Molecular Research. 2 (1): 136-147.
- Srivastava, S., Singh, V. P., Kumar, R., Srivastava, M., Sinha, A. y Simon, S. 2011. *In vitro* evaluation of carbendazim 50% WP, antagonists and botanicals
- Summanwar, A. S., Rayeehandhuri, S. P. y Pathak, S. C. 1966. Association of fungus *Fusarium moniliformae* sheld with the malformation in mango. Indian J Phytopathol. 19: 227-228.
- Sun, S., Kim, M., Van, K., Lee, Y. H., Zhong, C., Zhu, Z., Lestari, P., Lee, Y. W. y Lee, S. H. 2014. First Report of *Neocosmospora vasinfecta* var. *Vasinfecta*. Causing Soybean Stem Rot in South Korea. Plant Disease. 98. 1744-1744. doi:10.1094/PDIS-06-14-0637-PDN.
- Tamay, D. I. 2013. Fundamentos de la Reaccion en Cadena de Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigacion en Discapacidad: 70-78.
- Tucuch, C. F. M., Pérez, A. P., Naal, R. K. y Estrada, C. G. 2005. Manejo del cultivo de mango en el Estado de Campeche. Folleto Técnico. INFAP. 80 p
- Turgeon, G. 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. Annu Rev Phytopathol. 36: 115-137.
- Van Staden, J. y Nicholson, R. J. D. 1989. Cytokinins and mango flower malformation. The Cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate (8-¹⁴C) adenine into cytokinis. Physiological and Molecular Plant Pathology. 35:423-431.

- Vega, P. A. y Miranda, S. M. A. 1993. Distribución, incidencia y severidad de la escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.) en el Valle de Apatzingán, Mich. Rev. Mex. Fitopatol. 11:1-4.
- Vega-Piña, A., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G., Sánchez-García, P. y Otero-Colina, G. 2004. Período de agobio hídrico, intensidad de poda y uso de agroquímicos en un programa de manejo integrado de escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 61-71.
- Vera, E. 2013. Identificación morfológica y molecular de especies de *Fusarium* en plantas de noche buena. Tesis Bach. Puebla, México, Instituto Tecnológico de Tehuacán. 40 p.
- Waalwijk, C., Mendes, O., Verstappen, E. C. P., de Waard, M. A. y Kema, G. H. J. 2002. Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. Fungal Genet Biol. 35: 277-286
- Yang, Z. y Rannala, B., 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews Genetics. 13: 303-314.
- Yossen, V. E. y Conles, M. Y. 2014. Efficacy of fungicides used *in vitro* to control *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*, causal agents of oregano wilting in Argentina. Revista industrial y agrícola de Tucumán. 91 (1): 19-25.
- 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.
- Zheng, Q. y Ploetz, R. 2002. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. Plant Pathol. 51:208–218.

X. ANEXOS

Mango malformation disease caused by *Fusarium neocosmosporiellum* in Mexico

LORENA MOLINA-CÁRDENAS¹, GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ-URQUÍDEZ¹,
LUIS ALFONSO AMARILLAS-BUENO², TOMÁS AARÓN VEGA-GUTIERREZ¹, MARTÍN ABRAHAM TIRADO-
RAMÍREZ¹, TERESA DE JESÚS VELÁZQUEZ-ALCARAZ¹, SIXTO VELARDE-FÉLIX³
AND CARLOS ALFONSO LÓPEZ-ORONA ¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Carretera Culiacán-Eldorado Km 17.5, 80000, Culiacán, Sinaloa, Mexico

²Departamento de Investigación, Instituto de Investigación Lightbourn A.C, Jiménez, Chihuahua, Mexico

³Campo Experimental Valle de Culiacán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (Campus Culiacán), Culiacán, Sinaloa, Mexico

(Accepted 19 January 2021)

Abstract: Mango malformation disease caused by *Fusarium* spp. is one of the main limiting factors for mango production in Mexico. Fungal isolates obtained from symptomatic tissue from mango trees in Sinaloa, Mexico, were subjected to phylogenetic analysis of the *TEF-1a* gene, and evaluated for mating type, morphological markers and pathogenicity. Fifteen monosporic *Fusarium* isolates were identified as *Fusarium neocosmosporiellum* O'Donnell & Geiser. Phylogenetic analysis confirmed that the sequence obtained in this study corresponds to *F. neocosmosporiellum*. All 15 isolates were found to be pathogenic, but no differences were observed in aggressiveness among the isolates, which may be a result of low genetic variability within the fungal population. According to the morphological and molecular results, this study confirmed that the causal agent of mango malformation disease was *F. neocosmosporiellum*. This is the first report of mango malformation disease caused by this fungus in Mexico. This study provides a basis for the development and implementation of an integrated management system for this disease, confirms a new location of this fungus, and highlights that this pathogen is a potential threat to mango cultivation in Mexico.

Keywords: *Fusarium neocosmosporiellum*, mango, mating type, Mexico, virulence

Résumé: La malformation du manguiier, causée par *Fusarium* spp., est un des principaux facteurs qui limite la production de mangues au Mexique. Des isolats fongiques obtenus de tissus symptomatiques provenant de manguiiers poussant dans l'État du Sinaloa, au Mexique, ont été soumis à l'analyse phylogénétique du gène de la *TEF-1a* et évalués pour en déterminer le type sexuel, les marqueurs morphologiques et la pathogénicité. Quinze isolats monospores ont été identifiés en tant que *Fusarium neocosmosporiellum* O'Donnell & Geiser. L'analyse phylogénétique a confirmé que la séquence obtenue dans le cadre de cette étude correspondait à *F. neocosmosporiellum*. Les 15 isolats se sont avérés pathogènes, mais aucune différence n'a été observée quant à l'agressivité parmi ces derniers, ce qui peut émaner d'une faible variabilité génétique au sein de la population fongique. Selon les résultats des analyses morphologiques et moléculaires, cette étude a confirmé que l'agent causal de la malformation du manguiier était *F. neocosmosporiellum*. Il s'agit de la première mention de la malformation du manguiier causée par ce champignon au Mexique. Cette étude fournit une base pour élaborer et appliquer un système de gestion intégrée de cette maladie, confirme une nouvelle localisation pour ce champignon et démontre que cet agent pathogène constitue une menace possible pour la production de mangues au Mexique.

Mot clés: *Fusarium neocosmosporiellum*, mangue, type sexuel, Mexique, virulence

Correspondence to: Carlos Alfonso López-Orona. E-mail: clopezorona@uas.edu.mx

© 2021 The Canadian Phytopathological Society

Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is the most economically important fruit in tropical and subtropical regions of the world (FAO 2020). In 2018, Mexico ranked sixth worldwide in terms of cultivated area and production, preceded by India, China, Thailand, Indonesia, and Pakistan (FAO 2020). However, mango production is affected worldwide by mango malformation disease (MMD), one of the most problematic mango diseases. The disease affects vegetative and flower buds (Ploetz 2007). Initially trees exhibit bud swelling and vegetative malformation, followed by eruption of multiple shoots, ending in a bunchy and deformed apex. The disease was first recorded in India in 1891 (Krishnan et al. 2009) and is currently distributed in all mango-producing regions in the world (Morales and Rodríguez 2009; Qi et al. 2013).

The fungus *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas has been reported as a causal agent for the disease (Freeman et al. 1999; Bhavna et al. 2014), as have other species of the *Fusarium* genus complex, such as: *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (Mora 2000), *Fusarium decemcellulare* (Berk. & Broome) Rossman & Samuels (Castellano and Guanipa 2004), *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Wingfield & Marasas (Britz et al. 2002), *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (Zhan et al. 2010), and *Fusarium tupaense* Lima, Pfenning & Leslie (Crespo et al. 2016). In Mexico, species that are reported to cause MMD include *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) P. Nelson, Toussoun & Marasas and *F. oxysporum* in the states of Michoacán, Guerrero, and Morelos (Mora 2000). In more recent studies, *Fusarium mexicanum* Aoki, Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz & O'Donnell (Otero-Colina et al. 2010; Betancourt et al. 2012) and *Fusarium pseudocircinatum* Nirenberg & O'Donnell (Freeman et al. 2014) were identified as causal agents of mango malformation disease.

Many members of the *Fusarium solani* species complex (FSSC), including *Fusarium neocosmosporiellum* O'Donnell & Geiserare, are known to cause severe diseases on plants including peas, beans, tomatoes, and tuber roots (Leslie and Summerell 2006). The FSSC is constituted by more than 60 phylogenetic species (Schroers et al. 2016). Currently, only 23 phylogenetic species have been unambiguously identified and validated as part of the FSSC (Sandoval-Denis and Crous 2019), and they are morphologically indistinguishable. (Short et al. 2013; Scheel et al. 2013; Sandoval-Denis and Crous 2019).

Control methods can be very difficult to find when a new disease emerges, particularly if the causal agent is not properly identified. The implementation of appropriate disease management measures requires a reliable identification and detection of the pathogen (Moine et al. 2014). In addition to classical morphological identification, the use of molecular biology techniques, especially those involving the polymerase chain reaction (PCR), have provided a rapid and sensitive approach for the detection and identification of plant pathogens (O'Donnell 2000; Vincenlli and Tisserat 2008). Several DNA regions, particularly, the translation elongation factor 1- α (TEF-1- α) gene, are useful for the identification of *Fusarium* spp. (O'Donnell et al. 1998; Geiser et al. 2004).

The objectives of this study were to: identify and characterize the pathogen that causes mango malformation in Sinaloa, Mexico, using morphological and molecular methods, and pathogenicity tests.

Materials and methods

Diseased plant sampling and fungal isolation

In June 2018, Mango trees were observed with symptoms of floral and plant malformation in the municipality of El Rosario (22° 59' 31" N; 105° 51' 4" W), Sinaloa, Mexico. Symptomatic tissues were collected from 15 symptomatic mango trees. Symptomatic trees exhibited bud swelling, vegetative malformation and eruption of multiple shoots ending in a bunchy and deformed apex. Each diseased sample was obtained from a different mango tree. Symptomatic tissues were sampled with a sterile scalpel, transported to the laboratory, and immediately surface-disinfected in 0.5% NaOCl (3 min) and 70% ethanol (3 min), and rinsed twice (5 min) in sterile distilled water. After drying on sterile absorbent paper, the samples were placed in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). To obtain monospore cultures, the methodology proposed by Hansen and Smith (1932) was followed. A small fragment of the mycelium from 6-day-old PDA cultures was transferred into 1.0 mL of sterile distilled water, serially diluted, and then plated on a new PDA dish. Two days later, the cultures were observed under a microscope, and individual germinating microspores were transferred to fresh PDA.

Morphological characterization

Morphological characterization was performed following Leslie and Summerell (2006). Isolates were cultivated on PDA at 25 °C in the dark, after which, the colour of the

colony and formation of aerial mycelium were observed. On Carnation Leaf Agar (CLA) medium, under the same conditions previously mentioned, microconidial and macroconidial shape, septation, arrangement of conidigenous cells, and the presence or absence of sporodochia and chlamydospores were recorded and measured ($n = 50$) under a light microscope at 40 \times magnification.

DNA extraction and PCR assays

The mycelium of each isolate was collected by scraping the surface of colonies growing on PDA previously incubated for 1 week at 25°C. After grinding 100 mg of fungal mycelia from each isolate in liquid nitrogen, the genomic DNA was extracted using the method described by Ausubel et al. (2003). The DNA concentration and quality were estimated using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Fisher Scientific).

The DNA extracted from the *Fusarium* isolates was analysed by PCR with the primers listed in Table 1. The final reaction mixture (25 μ L) contained 100 ng DNA templates, an equimolar mixture of dNTPs, 25 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polymerase, and 40 pmol of each oligonucleotide (Bioline, TN, USA). The sequences of all the primers and PCR conditions used are provided in Table 1. EF-1 and EF-2 are the primers for TEF-1 α , MAT-1 and MAT-2 are primers to determine mating type 1 and mating type 2, respectively.

The PCR products (TEF-1 α DNA) were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The TEF-1 α DNA sequences were used to search for sequence similarity against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLASTN programme. The molecular identification was confirmed via BLAST on the FUSARIUM

ID and Fusarium MLST databases. Species were identified based on 100% sequence identity as the threshold.

Phylogenetic analyses

The TEF-1 α sequence from one representative isolate (66VRSIN) was aligned with reference sequences (indicated in Fig. 2) of the *Fusarium solani* species complex (FSSC) obtained from GenBank using the multiple alignment in ClustalW of the Geneious R9 software, and phylogenetic relationships among the *Fusarium* isolates were inferred based on the nucleotide sequence alignment of the gene. Trees were constructed by the neighbour-joining method based on distances determined by the method of Jukes and Cantor (Erickson 2010) using 1000 bootstrap replicates.

Pathogenicity studies

All fungal isolates were tested for their ability to cause mango malformation disease by experimental inoculation of healthy 4-month-old mango plants (cv. 'Kent') maintained under greenhouse conditions for 12 months. The inoculum was prepared by culturing the isolates on CLA under cool-white fluorescent light for 14 days at 25°C to stimulate sporulation (Freeman et al. 1999). The pathogenicity test was conducted during 2018–2020. Inoculation of apical buds was performed by placing a 20 μ L drop of conidial suspension (5×10^7 conidia per mL) on dormant buds. Six buds were inoculated per branch, with two branches per plant, and 20 plants inoculated per isolate. Apical bud inoculation on control plants was performed with 20- μ L drops of sterile distilled water. Pathogenicity experiments were conducted twice. Isolation of fungi was conducted from developing

Table 1. Reaction conditions and sequences of primers for PCR analysis of *Fusarium* spp.

Primer code	Sequence (5' → 3')	Expected fragment size (bp)	Specificity	PCR conditions
F: MAT-1	CGCCCTCTKAAYGSC TTCATG	≈200	MAT-1 ^a	30 cycles; 30 s at 94°C, 1 min at 59°C, 1 min at 72°C
R: MAT-1	GGARTARACYTTAGCAATYAGGGC			
F: MAT-2	CGACCTCCCAAYGCYTACAT	≈800	MAT-2 ^a	30 cycles; 30 s at 94°C, 1 min at 59°C, 1 min at 72°C
R: MAT-2	TGGGCGTACTGGTARTCRGG			
F: EF-1	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	≈698	<i>Fusarium</i> spp. ^{bc}	30 cycles; 30 s at 94°C, 30 s at 59°C, 1 min at 72°C
R: EF-2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C) ATCATGTT			

F: primer forward

R: primer reverse.

^aLeslie and Summerell (2006);

^bGeiser et al. (2004);

^cO'Donnell et al. (1998).

lesions on inoculated plants, and the isolates were identified to species using morphological characteristics and the sequencing of the TEF1- α gene.

The severity of the disease was assessed using a scale of 0 to 5 as proposed by Iqbal et al. (2006) (Table 2), in which 0 is a plant with no symptoms and 5 is a plant with the most severe symptoms.

Data analysis

The data obtained from the pathogenicity test were subjected to a non-parametric analysis of variance with the Kruskal–Wallis and Dunn test ($p \leq 0.05$). All statistical analyses were performed with the XLSTAT software.

Table 2. Disease severity scale for mango malformation disease proposed by Iqbal et al. (2006).

Value	Symptoms
0	No symptoms
1	Bud swelling for vegetative and floral malformations
2	Eruption of multiple shoots (vegetative) or short and thick rachis (floral)
3	Clustered shoots with shortened internodes (vegetative) or thickened peduncles (floral)
4	Small scaly leaves (vegetative) or flowers (floral)
5	Bunchy apex (vegetative) or compact deformed panicle (floral)

Results

Fifteen monosporic isolates of *Fusarium* spp. were obtained from diseased plant material from 15 mango trees with symptoms of floral and plant malformation in the municipality of El Rosario, Sinaloa, Mexico, in June 2018.

Morphological markers

Colonies of the 15 monosporic isolates of *Fusarium* spp. grown on PDA presented white and brown cottony mycelia (in the centre), with irregular edges (Fig. 1e). The microconidia ($n = 50$) were cylindrical to ellipsoidal oblong and hyaline, with 0–1 septa of $4.2\text{--}17.3 \times 2.3\text{--}7.9 \mu\text{m}$ (Fig. 1f). Macroconidia ($n = 50$) were hyaline, often almost straight and wider in the middle, from 3 to 4 septa of $41.1\text{--}75.7 \times 4.9\text{--}11.1 \mu\text{m}$ (Fig. 1g). The teleomorphic phase (*Neocosmospora vasinfecta* E.F. Sm.) was observed. The perithecia ($n = 20$) were orange to red, pear-shaped, with a short neck, $185.3\text{--}294.6 \times 126.4\text{--}220.7 \mu\text{m}$ (Fig. 1i). The cylindrical asci ($n = 30$) contained eight ascospores and had short pedicels measuring $78.3\text{--}89 \times 6.5\text{--}8.8 \mu\text{m}$ (Fig. 1j). The ascospores ($n = 50$) were globose,

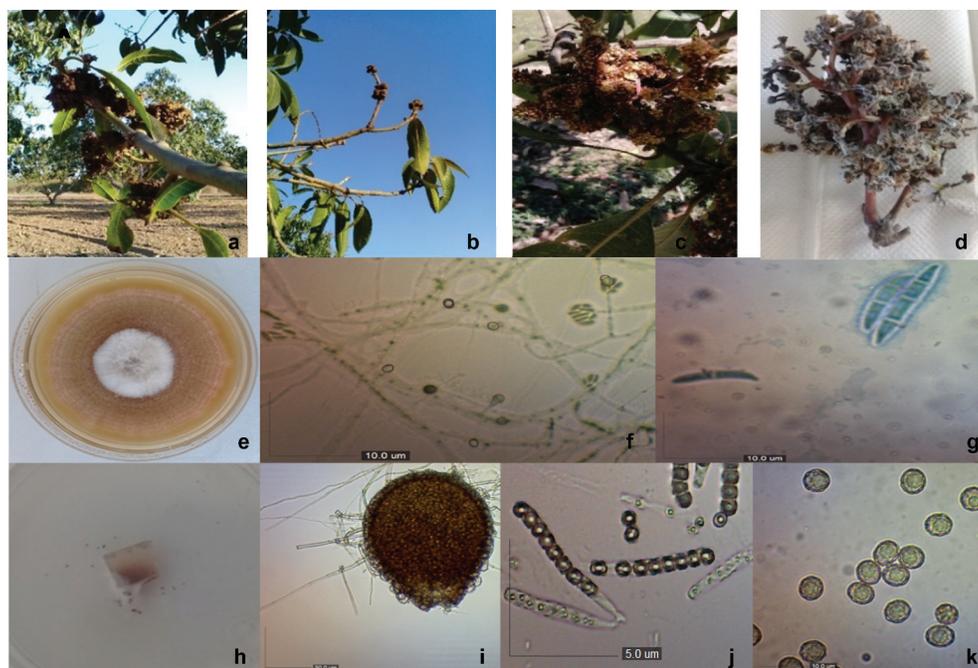


Fig. 1 a–d, (Colour online) Symptoms of mango malformation disease caused by *Fusarium neocosmosporiellum* from sampled trees. e–k, *F. neocosmosporiellum* morphological features. e, Top view of a *F. neocosmosporiellum* colony grown on PDA; f, Microconidia *in situ* (10 μm bar); g, Macroconidia (10 μm bar); h, Exudation of ascospores; i, Perithecia (50 μm bar); j, Ascus (5 μm bar); k, Ascospores with ornate wall (10 μm bar).

cylindrical, unicellular, with rough walls of 12.9–29.8 × 11.7–26.5 µm (Fig. 1k).

PCR assays and phylogenetic analysis

PCR analysis of the 15 isolates of *Fusarium* spp. amplified the expected fragment of the TEF-1α gene (683 bp).

The TEF-1α sequence of isolate 66VRSIN was submitted to Genbank (sequence MK932796). The analysis of TEF-1α sequences of these isolates by BLAST in the GenBank, Fusarium ID and Fusarium MLST databases showed that all were affiliated to the species *F. neocosmosporiellum* with a homology of 99.9 to 100%. The MAT2 gene fragment (800 bp) was amplified for all 15 isolates, indicating they were all mating type 2.

The phylogram generated with the partial sequences of the TEF-1α gene from isolate 66VRSIN (MK932796) and other species from the FSSC obtained from GenBank was divided into groups, aligning each species of *Fusarium* (Fig. 2). The first group corresponds to *F. falciforme*, the second group was aligned with isolates of the species *Fusarium keratoplasticum*. A third small group was formed and included FSSC from different crops including mango. Finally, the fourth group was aligned with isolates of *F. neocosmosporiellum* isolated from different sources. The TEF-1α sequence

(MK932796) from the 66VRSIN isolate was aligned with the group of *F. neocosmosporiellum* (Fig. 2).

Pathogenicity tests

There were no significant differences between the two assays in terms of symptom severity on mango plants (cv. ‘Kent’) at 270 dpi ($P = 0.0782$), with an average disease severity of 4.5 in the first assay and 4.6 in the second assay.

The 15 monoconidial *F. neocosmosporiellum* isolates were pathogenic to mango cv. ‘Kent’. Although plants developed malformation on the vegetative buds following inoculation with each of the 15 isolates, no significant difference in virulence existed amongst the isolates according to the observed symptoms (Table 3). The first MMD symptoms were observed at 150 dpi on the inoculated plants in both assays, matching the symptoms originally observed in mango plants grown in commercial fields. Fungi were isolated from symptomatic tissues of inoculated plants and their identity determined to be *F. neocosmosporiellum* using morphological characteristics and sequencing of the TEF-1α gene, fulfilling Koch’s postulates. No symptoms were observed on the non-inoculated plants after 12 months (Fig. 3).

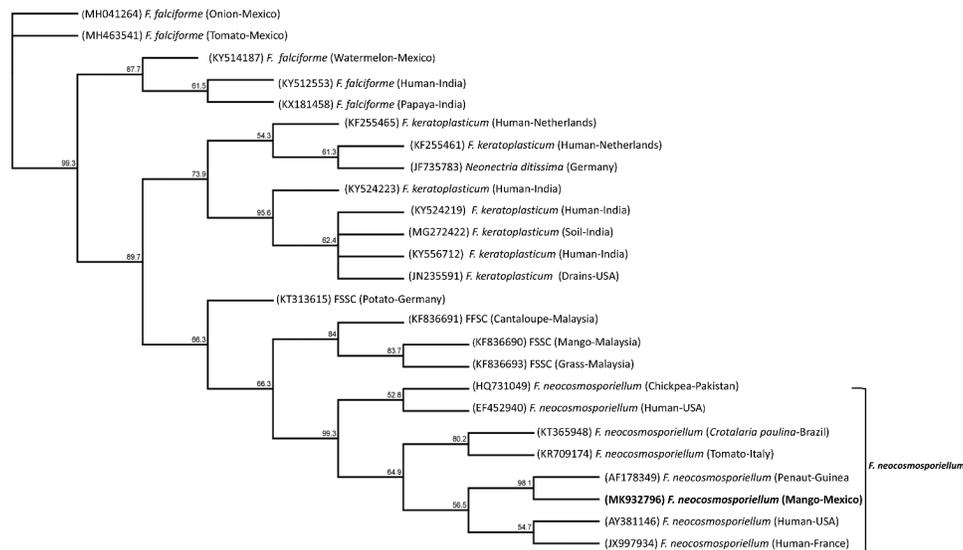


Fig. 2 Phylogram of neighbour-joining for TEF-1α gene from isolates of the *Fusarium solani* Species Complex and the sequence MK932796 of this study. Values at the nodes represent the percentage bootstrap scores (1000 replicates).

Table 3. Pooled results of the first and second pathogenicity assays of mango (cv. 'Kent') inoculated with 15 monoconidial *Fusarium neocosmosporiellum* isolates from mango trees.

Isolate	Disease incidence percentage	Mean disease severity	Range
66VRSIN	100	4.8 A	4–5
67VRSIN	100	4.7 A	4–5
80VRSIN	100	4.7 A	4–5
88VRSIN	100	4.7 A	4–5
82VRSIN	100	4.6 A	4–5
90VRSIN	100	4.6 A	4–5
69VRSIN	100	4.6 A	4–5
72VRSIN	100	4.6 A	4–5
76VRSIN	100	4.6 A	4–5
85VRSIN	100	4.6 A	4–5
63VRSIN	100	4.6 A	4–5
92VRSIN	100	4.6 A	4–5
87VRSIN	100	4.5 A	4–5
70VRSIN	100	4.5 A	4–5
97VRSIN	100	4.5 A	4–5
Non inoculated check	0	0.0	0
Overall mean*		4.6	

Disease incidence percentage, mean disease severity, and range of symptoms scored at 270 days post inoculation of each strain.

In a column, means followed by common letters indicate no significant differences among isolates at $P = 0.05$ by Dunn's multiple range test.



Fig. 3 a. (Colour online) Eruption of multiple shoots (vegetative) in mango plant inoculated with *Fusarium neocosmosporiellum*. **b.** Control plant without symptoms.

Discussion

This study confirmed the first occurrence in Mexico of mango malformation disease caused by *F. neocosmosporiellum*. The results provide the basis for the

development and implementation of appropriate disease management of this pathogen in Mexico.

The phylogenetic analysis indicated that our TEF-1 α sequence (MK932796) grouped closely with a sequence of *F. neocosmosporiellum* obtained from infected peanut plants. These two sequences were also grouped with other sequences from *F. neocosmosporiellum* isolates obtained from tomato, chickpea, *Crotalaria paulina* Schrank, and humans, whereas they were clearly distinguished from species of other clades of the FFSC, such as *F. falciforme* and *F. keratoplasticum*. The TEF-1 α gene was used in the present study to determine the specific identity of the isolates. It has also been used in other studies, since it provides very useful phylogenetic information at the species level for the genus *Fusarium*, and has been used as a marker to resolve relationships between species (Geiser et al. 2004).

All the isolates of *F. neocosmosporiellum* were pathogenic on mango cv. 'Kent', indicating that *F. neocosmosporiellum* is able to cause mango malformation disease, which represents an important problem for the production of mango. Fungi were recovered from inoculated symptomatic plants and showed the same morphological characteristics and TEF-1 α sequences as those of the originally inoculated isolates, thus confirming their pathogenicity.

In this study, no differences were observed in aggressiveness among the isolates. This may be a result of little genetic variability within the *F. neocosmosporiellum* populations. The isolates were of the same mating type (MAT 2), which suggests that only asexual reproduction occurs, generating a clonal population of this fungus. The isolates were obtained from different mango trees from different plots. However, more studies are needed to analyse the genetic diversity of this fungus, as well as its virulence.

Fusarium species are among the most challenging fungal species to manage in agricultural crops. Several agroecological techniques are known to impact *Fusarium* populations (Jarvis 1989), including sanitation, organic amendments, biological control, among others. Each of these techniques is only partly effective, necessitating an integrated control program, which further complicates adoption on farms where there is often limited flexibility for the uptake of new practices (Collange et al. 2014). Mango is a perennial crop, hence cultivars cannot be easily changed year after year as is the case with annual crops; therefore, it is necessary to implement resistance breeding programmes, biological control and other disease management practices. This study provides the basis for the development of an

integrated management system for this disease and confirms a new location of this fungus. It also highlights that this pathogen is a potential threat for mango production in Mexico.

Acknowledgements

Thanks are extended to CONACYT for the scholarship granted to Lorena Molina-Cárdenas to carry out her doctoral studies.

Funding

This work was supported by the Universidad Autónoma de Sinaloa.

ORCID

Carlos Alfonso López-Orona  <https://orcid.org/0000-0003-2603-5562>

References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Scidman JG, Smith JA, Struhl K. 2003. Current protocols in molecular biology. New York: Wiley.
- Betancourt RI, Velázquez MJ, Montero CJC, Fernández PSP, Lozoya SH, Rodríguez AG. 2012. *Fusarium mexicanum* agente causal de la malformación del mango en Jalisco, México. *Rev Mex Fitopatol.* 30:115–127.
- Bhavna J, Wahid AM, Bains G, Chandra PR, Shukla A, Tuteja N, Kumar J. 2014. *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation in the Tarai region of the Uttarakhand state of India. *Plant Signal Behav.* 9:1–3.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WF, Wingfield MJ. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycologia.* 94(4):722–730. doi:10.1080/15572536.2003.11833199
- Castellano G, Guanipa N. 2004. Comportamiento de diez cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) a la inoculación con *Fusarium decemcellulare* Brix. *Rev Fac Agron.* 21:200–206.
- Collange B, Navarrete M, Montfort F, Mateille T, Tavoillot J, Martiny B, Tchamitchian M. 2014. Alternative cropping systems can have contrasting effects on various soil-borne diseases: relevance of a systemic analysis in vegetable cropping systems. *Crop Prot.* 55:7–15. doi:10.1016/j.cropro.2013.10.002
- Crespo M, Arrebola E, Carzola FM, Maymon M, Freeman S, Aoki T, O'Donnell K, Torres JA, de Vicente A. 2016. Analysis of Genetic diversity of *Fusarium tupaense*, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. *Plant Dis.* 100:276–286. doi:10.1094/PDIS-02-15-0153-RE
- Erickson K. 2010. The Jukes-Cantor model of molecular evolution. *PRIMUS.* 20(5):438–445. doi:10.1080/10511970903487705
- FAO. 2020. Production statistics by crop. [accessed 2020 Feb]. www.fao.org/faostat/en/#data/QC.
- Freeman S, Maimon M, Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. *Phytopathology.* 89(6):456–461. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.6.456
- Freeman S, Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon MR, Ploetz RC, Aoki T, O'Donnell K. 2014. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. *Plant Dis.* 98(11):1583. doi:10.1094/PDIS-04-14-0375-PDN
- Geiser D, Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kulldau GA, O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.* 110:473–479. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0
- Hansen HN, Smith. 1932. The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 37:369–371.
- Iqbal Z, Rehman M, Dasti AA, Saleem A, Zafar Y. 2006. RAPD analysis of *Fusarium* isolates causing mango malformation disease in Pakistan. *World J Microb Biot.* 22:1161–1167. doi:10.1007/s11274-006-9157-x
- Jarvis WR. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Dis.* 73:190–194. doi:10.1094/PD-73-0190
- Krishnan AG, Nailwal TK, Shukla A, Pant RC. 2009. Mango (*Mangifera indica* L.) malformation an unsolved mystery. *Researcher.* 1(5):20–36.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd; p. 122–279.
- Moine LM, Labbe C, Louis-Seize G, Seifert KA, Belanger RR. 2014. Identification and detection of *Fusarium striatum* as a new record of pathogen to greenhouse tomato in northeastern America. *Plant Dis.* 98:292–298. doi:10.1094/PDIS-08-13-0844-RE
- Mora AJA. 2000. Patogénesis y epidemiología de la "Escoba de bruja" *Fusarium subglutinans* (Wollemwed y Reinking) y *F. oxysporum* (Schlecht.) del mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán, México [Tesis de Doctor en Ciencias]. Montecillo (Edo. México): Colegio de Postgraduados; p. 107.
- Morales RV, Rodríguez GM. 2009. Micobiota endofítica asociada al cultivo del mango 'Haden' (*Mangifera indica* L.) en el oriente de Venezuela. *Rev UDO Agrícola.* 9(2):393–402.
- O'Donnell K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia.* 92:919–938. doi:10.1080/00275514.2000.12061237
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Nat Acad Sci USA.* 95:2044–2049. doi:10.1073/pnas.95.5.2044
- Otero-Colina G, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía S, Maymon M, Ploetz RC, Aoki T, Freeman S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology.* 100(11):1176–1184. doi:10.1094/PHYTO-01-10-0029
- Ploetz RC. 2007. Diseases of tropical perennial crops: challenging problems in diverse environments. *Plant Dis.* 91:644–663. doi:10.1094/PDIS-91-6-0644
- Qi YQ, Pu JJ, Zhang X, Zhang H, Lu Y, Qun-Fang Y, Zhang HQ, Xie YX. 2013. First report of dieback of mango caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *J Phytopathol.* 161:735–738. doi:10.1111/jph.12117
- Sandoval-Denis M, Crous PW. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia.* 43:90–185. doi:10.3767/persoonia.2019.43.04

- Scheel CM, Hurst SF, Barreiros G, Akiti T, Nucci M, Balajee SA. 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. *BMC Infect Dis.* 13:49. doi:10.1186/1471-2334-13-49
- Schroers HJ, Samuels GJ, Zhang N, Short DP, Juba J, Geiser DM. 2016. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia.* 108:806–819. doi:10.3852/15-255
- Short DP, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH, Geiser DM. 2013. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet Biol.* 53:59–70. doi:10.1016/j.fgb.2013.01.004
- Vincenlli O, Tisserat N. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Dis.* 92:660–669. doi:10.1094/PDIS-92-5-0660
- Zhan RL, Yang SJ, Ho HH, Liu F, Zhao YL, Chang JM, He YB. 2010. Mango malformation disease in south China caused by *Fusarium proliferatum*. *J Phytopathol.* 158:721–725. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01688.x



Carlos Alfonso Lopez Orona <clopezorona@uas.edu.mx>

Plant Disease - Manuscript ID PDIS-11-21-2593-PDN

Plant Disease <onbehalf@manuscriptcentral.com>

26 de noviembre de 2021, 11:45

Responder a: pdsubmissions@scisoc.org

Para: anerol2022@gmail.com, clopezorona@uas.edu.mx, alfonsolopezurquidez@uas.edu.mx, tomasvega@uas.edu.mx, leo_roman16@hotmail.com, mitziestrada@uas.edu.mx

26-Nov-2021

Dear Dr. López Orona:

Your manuscript entitled "Occurrence of Mango malformation disease caused by *Fusarium incarnatum* in Mexico" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Plant Disease.

Your manuscript ID is PDIS-11-21-2593-PDN. Please mention the manuscript ID in all future correspondence or when calling the office with questions.

If you are not the corresponding author, you are receiving this message because you have been listed as a co-author on this manuscript.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/plantdisease>.

If there are any changes in your contact information, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/plantdisease> and edit your user information as appropriate.

APS recommends authors create or associate their existing ORCID record with their profile in Manuscript Central. If you do, we will automatically link your online article to your ORCID record.

Publication in Plant Disease requires payment of Article Publication Charges. Please refer to the online Information for Authors: <http://apsjournals.apsnet.org/page/authorinformation>

We offer significant discounts if the corresponding author of your paper is an APS member. If you are not presently an APS member and would like to join, you can do so by going to our website <http://www.apsnet.org/about/join/Pages/default.aspx>.

Instructions for final submission appear in the Plant Disease author information: <http://apsjournals.apsnet.org/page/authorinformation#submitting>

Thank you for submitting your manuscript to Plant Disease.

Sincerely,
Plant Disease Editorial Office