

# CANCROSIS EN RAMAS DE *Salix bonplandiana* KUNTH CAUSADA POR *Alternaria tenuissima* (KUNZE EX PERS.) WILTSHIRE

## CANKER IN *Salix bonplandiana* KUNTH TWIGS CAUSED BY *Alternaria tenuissima* (KUNZE EX PERS.) WILTSHIRE

J. Gerardo González-Díaz<sup>1</sup>, Rómulo García-Velasco<sup>1</sup>, Guadalupe Camacho-Cerón<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario Tenancingo-Universidad Autónoma del Estado de México, km 1.5 Carretera Tenancingo Villa Guerrero, 52400. Estado de México.(rgarciave@uaemex.mx).

<sup>2</sup>Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

### RESUMEN

*Salix bonplandiana* Kunth, una especie arbórea nativa del Valle de México, es usada para reforestación, sus ramillas en cestería y como ornamental, su madera para construir graneros y sus hojas como forraje. Por ello es importante identificar los agentes causales de enfermedades que afectan su desarrollo. Para determinar el agente causal de la enfermedad que produce canchros en ramas de *S. bonplandiana* se efectuaron aislamientos y pruebas de patogenicidad. Las muestras recolectadas de tallos y ramas con canchros se sembraron en PDA y se incubaron 72 h a 25 °C. El hongo se purificó y se realizaron pruebas de patogenicidad en tres tratamientos: T1) lesiones en ramas de *S. bonplandiana* donde se inoculó una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo, T2) lesiones inoculadas con agua destilada estéril, y T3) testigo absoluto. Los primeros canchros de la enfermedad se observaron en T1 y T2, 11 d después de la inoculación. De estos canchros se reisoló el hongo *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire con características iguales al inóculo inicial. Además, la secuenciación del ADNr-ITS mostró 99 % de homología con las secuencia de *A. tenuissima* reportada en el GenBank-NCBI.

**Palabras clave:** sauce, canchros, patogenicidad.

### INTRODUCCIÓN

El sauce, *Salix bonplandiana* Kunth o ahuejote, es un árbol originario del Valle México ampliamente distribuido desde el suroeste de los EE.UU. hasta Guatemala a través de casi todo el territorio mexicano. Se desarrolla en climas templados y

### ABSTRACT

*Salix bonplandiana* Kunth, a tree species native to the Valley of México, is used for reforestation; its branches in basketry and ornaments, its wood for building barns, and its leaves as fodder. It is therefore important to identify the causative agents of diseases that affect its development. To determine the causative agent that produces cankers on branches of *S. bonplandiana*, isolates were conducted as well as pathogenicity tests. The collected samples of stems and branches with cankers were planted on PDA and incubated for 72 h at 25 °C. The fungus was purified and tested for pathogenicity in three treatments: T1) lesions on branches of *S. bonplandiana* which was inoculated with a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus; T2) lesions inoculated with sterile distilled water; and T3) absolute control. The first cankers of the disease were observed in T1 and T2, 11 d after inoculation. From these cankers the fungus *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers) Wiltshire was reisolated with characteristics equal to the initial inoculum. In addition, the rDNA-ITS sequencing showed 99 % homology with the sequence of *A. tenuissima* reported in the NCBI-GenBank.

**Keywords:** willow, canker, pathogenicity.

### INTRODUCTION

Willow, *Salix bonplandiana* Kunth or ahuejote, is a tree native to the Valley of México widely distributed from the southwest of the United States to Guatemala through almost the entire Mexican territory. It grows in temperate climates, and acidic and moist soils favor it. It is a fast growing species that lives 20 to 30 years and has potential for the restoration of eroded areas. For these reasons, plantations for

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Mayo, 2010. Aprobado: Enero, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 75-86. 2011.

le favorecen suelos ácidos y húmedos. Es una especie de crecimiento rápido que vive 20 a 30 años y tiene potencial para restauración de zonas erosionadas. Por ello se han establecido plantaciones con fines de reforestación en el Distrito Federal y Durango, México. Además sus ramillas se usan en cestería, su madera para construir graneros eficaces contra plagas y sus hojas como forraje (Quintero y Villa, 1991); ramas y ramillas deshidratadas se usan como material de relleno en arreglos florales con flores frescas o deshidratadas.

Las enfermedades más importantes en diversas especies de *Salix* sp. son causadas por hongos que dañan raíz, corteza, brotes y hojas, además de bacterias que dañan ramas (Nejad *et al.*, 2004; Anselmi *et al.*, 2006). La importancia del daño ocasionado por dichas enfermedades varía de acuerdo con la finalidad de la plantación. En plantaciones para usos ornamentales los problemas más severos derivan de microorganismos que causan manchas foliares, marchitamientos y defoliación prematura. También se presentan patógenos causantes de enfermedades que conducen a pudrición en la raíz, dañan los tallos y pueden provocar caída repentina de los árboles o rompimiento de ramas (Anselmi *et al.*, 2006).

Las principales enfermedades que dañan tallos y ramas son necrosis provocadas por *Discella carbonacea* Berk. & Broome, *Cytospora* spp. y *Phomopsis* spp., costra del sauce causada por *Venturia chlorospora* Sacc. (Anselmi *et al.*, 2006), cancro del sauce causado por *Melampsora* spp. (Ostry y Anderson, 2001), cancro negro cuyo agente causal es *Glomerella myabeana* Fuck. (Spiers y Hopcroft, 1993), bacteriosis causada por *Erwinia salicis* (Day) Chester (Sakamoto *et al.*, 1999); además, *Pseudomonas* sp. (Hunter y Stott, 1978), *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson y *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. causan daños menores. La incidencia de una enfermedad desconocida en tallos y ramas de árboles de sauce de 1 a 3 años de edad ha aumentado y provoca canchros, lo que disminuye el valor de las plantas y las hace inadecuadas para usos más rentables (Anselmi *et al.*, 2006).

Debido a su potencial como especie ornamental, en Tenancingo, Estado de México, se estableció una plantación de *S. bonplandiana*, en la cual se presentó un problema fitosanitario. El objetivo del presente estudio fue determinar la etiología de la canchrosis en ramas de *S. bonplandiana*.

reforestación have been established in Mexico City and Durango, Mexico. Besides its twigs are used in basketry, its wood to build barns effective against pests, and its leaves as fodder (Quintero and Villa, 1991); dried branches and twigs are used as filler in floral arrangements of fresh or dried flowers.

The most important diseases in various species of *Salix* spp. are caused by fungi that damage roots, bark, buds and leaves, besides bacteria that damage branches (Nejad *et al.*, 2004; Anselmi *et al.*, 2006). The extent of the damage caused by these diseases varies in accordance with the purpose of the plantation. In plantations for ornamental purposes the most severe problems arise from microorganisms that cause leaf spots, wilting and premature defoliation. There are also disease-causing pathogens that lead to root rot, stem damage and can cause the sudden fall of trees or breaking of tree branches (Anselmi *et al.*, 2006).

The main diseases that damage stems and branches are necrosis caused by *Discella carbonacea* Berk. & Broome; *Cytospora* spp. and *Phomopsis* spp.; willow scab caused by *Venturia chlorospora* Sacc. (Anselmi *et al.*, 2006); willow canker caused by *Melampsora* spp. (Ostry and Anderson, 2001), black canker whose causal agent is *Glomerella myabeana* Fuck. (Spiers and Hopcroft, 1993), a bacterial blight caused by *Erwinia salicis* (Day) Chester (Sakamoto *et al.*, 1999); in addition, *Pseudomonas* sp. (Hunter and Stott, 1978), *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson and *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. The incidence of an unknown disease on stems and branches of willow trees 1 to 3 years of age has increased and causes cankers, which diminishes the value of plants and makes them unsuitable for more profitable uses (Anselmi *et al.*, 2006).

Because of its potential as an ornamental species, a *S. bonplandiana* plantation was established in Tenancingo, State of Mexico, where a phytosanitary problem arose. The aim of this study was to determine the etiology of canker on branches of *S. bonplandiana*.

## MATERIALS AND METHODS

### Pathogen isolation

On the premises of the UAEM Tenancingo University Center in the Tenancingo-Villa Guerrero highway, Tenancingo

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del patógeno

En las instalaciones del Centro Universitario UAEM Tenancingo, en la Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Municipio de Tenancingo, Estado de México, México, se recolectaron muestras con lesiones sobre ramas de árboles de *S. bonplandiana* y se llevaron al laboratorio para identificar el agente causal.

De cada muestra de las lesiones en las ramas se seleccionaron cortes de 0.5 cm<sup>2</sup>, con las orillas de las lesiones en el margen del tejido sintomático, se lavaron con agua destilada y sumergieron 2 min en hipoclorito de sodio al 2 %, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron en papel desecante estéril. Se sembraron cinco trozos por caja petri Kimax® con papa-dextrosa-agar (PDA) Bioxon®. Las siembras se colocaron en una incubadora (Riossa®) a 25 °C por 72 h. La colonia desarrollada se transfirió a PDA para su purificación y se obtuvo un cultivo monospórico (Agrios, 2005; Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

### Identificación del patógeno

La identificación se realizó con base en las características del micelio y conidios; crecimiento del hongo en diferentes medios de cultivo y pruebas moleculares. Para observar las estructuras en el microscopio óptico (Carl Zeiss®), se hicieron preparaciones permanentes de las colonias en glicerol al 50 % acidificada con HCl 12 N. El hongo aislado se identificó con claves taxonómicas de Rotem (1994) y la descripción de Ellis (1971).

El hongo fitopatógeno se sembró en cinco medios de cultivo: PDA (39 g PDA 1000 mL<sup>-1</sup> agua destilada), extracto de malta (EM) (50 g de extracto de malta (Difco®) y 37.5 g de agar (Merck®) en 1000 mL de agua destilada, harina de maíz (HM) (20 g de harina de maíz (Minsa®) y 20 g de agar (Merck®) en 1000 mL de agua destilada, Czapek's (C) (30 g sacarosa, 3 g nitrato de sodio, 1 g fosfato de potasio, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.5 g cloruro potasio y 0.01 g sulfato de hierro en 1000 mL de agua destilada) y extracto de tallo de *S. bonplandiana* (ET) (25.6 mL extracto de tallo, 38.5 g agar Merck® en 1000 mL de agua destilada).

Para obtener el extracto de tallo se pesaron 25 g de corteza del tallo de arbustos de un año de edad y se trituró con 50 mL de agua destilada estéril. El sobrenadante se filtró con papel filtro No. 3 y se centrifugó 5 min a 2000 rpm.

Con el cultivo monospórico obtenido en PDA se sembró un disco de 0.6 cm de diámetro en cada medio de cultivo PDA, EM, HM, C y ET. Para cada medio de cultivo se tomaron lecturas cada 12 h, para registrar el tiempo de desarrollo de los primeros conidios. Los conidios obtenidos en cada medio se observaron

Municipality, State of México, México, samples with lesions on branches of trees of *S. bonplandiana* were collected and taken to the laboratory to identify the causative agent.

From each sample of lesions in the branches, sections of 0.5 cm<sup>2</sup> were selected, with the edges of the lesions in the margin of the symptomatic tissue; then they were washed with distilled water and immersed 2 min in sodium hypochlorite at 2 %, and washed twice with sterile distilled water and placed in desiccant sterile paper. Five pieces per Kimax® petri plate with potato-dextrose-agar (PDA) Bioxon® were planted. Plantings were placed in an incubator (Riossa®) at 25 °C for 72 h. The colony developed was transferred to PDA for purification and yielded a monosporic culture (Agrios, 2005; Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

### Pathogen identification

The identification was made based on the characteristics of mycelia and conidia, growth of the fungus in different growth media and molecular testing. To observe the structures in the light microscope (Carl Zeiss®), permanent preparations of the plantations were made with glycerol 50 % acidified with HCl 12 N. The isolated fungus was identified with the taxonomic keys by Rotem (1994) and description by Ellis (1971).

The phyto-pathogenic fungus was sown in five growth media: PDA (39 g PDA 1000 mL<sup>-1</sup> distilled water), malt extract (ME) (50 g of malt extract Difco®) and 37.5 g of agar (Merck®) in 1000 mL of distilled water, corn flour (HM) (20 g corn flour (Minsa®) and 20 g of agar (Merck®) in 1000 mL of distilled water, Czapek's (C) (30 g sucrose, 3 g sodium nitrate, 1 g potassium phosphate, 0.5 g magnesium sulfate, 0.5 g potassium chloride and 0.01 g iron sulphate in 1000 mL of distilled water), and stem extract of *S. bonplandiana* (ET) (25.6 mL stem extract, 38.5 g agar Merck® in 1000 mL of distilled water).

To obtain the stem extract 25 g of stem bark of shrubs of one year old were weighed and triturated with 50 mL of sterile distilled water. The supernatant was filtered with filter paper No. 3 and centrifuged for 5 min at 2000 rpm.

With the monosporic culture obtained in PDA a disc of 0.6 cm in diameter was planted in each growth medium, namely PDA, EM, HM, C and ET. For each growth medium, readings every 12 h were made to record the time of development of the first conidia. The conidia obtained in each medium were observed to confirm the identity of the fungus. The morphological identification was confirmed by sequencing; the internal transcribed spacer area (ITS) was amplified with universal primers (White *et al.*, 1990; Bridge and Arora, 2000).

The extraction of DNA from *Alternaria tenuissima* was performed with the 3 % CTAB method described by Ahrens and

para corroborar la identidad del hongo. La identificación morfológica se confirmó mediante secuenciación: se amplificó la región espaciadora interna transcrita (ITS) con iniciadores universales (White *et al.*, 1990; Bridge y Arora, 2000).

La extracción del ADN de *Alternaria tenuissima* se realizó con el método de CTAB 3 % descrito por Ahrens y Seemüller (1992). Se pesaron 0.03 g de micelio liofilizado y maceraron en mortero con nitrógeno líquido. El polvo se transfirió a tubos eppendorf estériles con 200  $\mu\text{L}$  de CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8.0,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   $2\text{H}_2\text{O}$  20 mM, CTAB 3 %, NaCl 1.4 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.2 %) previamente calentado a 60 °C, se agitó vigorosamente y se adicionaron 600  $\mu\text{L}$ ; se incubó 1 h a 60 °C y agitó ocasionalmente. Después se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), se mezcló, y se centrifugó 8 min a 14 000 rpm. La fase acuosa se colocó en un tubo eppendorf nuevo y estéril, se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión e incubó por 1 h a -20 °C para precipitar el ADN. Luego se centrifugó 8 min a 14 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente (24 °C) y se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. La integridad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S y 28S que son altamente conservados y se encuentran unidos internamente por las regiones ITS1 e ITS2. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: amortiguador 1X,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, dNTP's 0.2 mM, *Taq* ADN polimerasa 1U (Invitrogen) y 20 pmol de cada iniciador. Del ADN obtenido se usaron 100 ng en la PCR. El programa de amplificación consistió de 94 °C por 2 min de desnaturalización inicial, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C 30, 72 °C por 2 min y 72 °C por 10 min de extensión final. El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y fue secuenciado en Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en el Banco de Genes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Debido a que el hongo identificado no es considerado patógeno de *S. bonplandiana*, a partir del cultivo monospórico obtenido para su identificación, el aislado se incrementó en medio de cultivo PDA para realizar los postulados de Koch (Agrios, 2005).

### Diseño experimental y variables evaluadas

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cuatro bloques y seis repeticiones por bloque, y tres tratamientos: T1 lesiones en la epidermis inoculadas con una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios del hongo patógeno  $\text{mL}^{-1}$  en ramas de arbustos

Seemüller (1992); 0.03 g of mycelium lyophilized and macerated in a mortar with nitrogen liquid were weighed. The powder was transferred to sterile eppendorf tubes with 200  $\mu\text{L}$  of CTAB (100 mM Tris-HCl; pH 8.0;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   $2\text{H}_2\text{O}$  20 mM; CTAB 3 %; NaCl 1.4 M; 0.2 %  $\beta$ -mercaptoethanol), preheated at 60 °C, stirred vigorously adding 600  $\mu\text{L}$ , and incubated for 1 h at 60 °C and stirred occasionally. Then 600  $\mu\text{L}$  of chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v / v) were added, mixed, and centrifuged for 8 min at 14 000 rpm. The aqueous phase was placed in a new sterile eppendorf tube, and 600  $\mu\text{L}$  of cold isopropanol were added, mixed gently by inversion and incubated for 1 h at -20 °C to precipitate the DNA. Then it was centrifuged for 8 minutes at 14 000 rpm and the supernatant was removed. The pellet obtained was dried at room temperature (24 °C) and dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water. The integrity of the DNA obtained was verified by electrophoresis in an agarose gel at 1 %.

The universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used to amplify the nuclear ribosomal genes 18S, 5.8S and 28S that are highly conserved and are united internally by the ITS1 and ITS2 regions. The reaction conditions were: 1X buffer, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTP's, 1U polymerase *Taq* DNA (Invitrogen) and 20 pmol of each primer. From the DNA obtained 100 ng were used in the PCR. The amplification program consisted of 94 °C for 2 min of initial denaturation, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 30 s, 72 °C for 2 min and 72 °C for 10 min of final extension. The amplified DNA was analyzed by electrophoresis in 2 % agarose gel and was sequenced in Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). The sequences obtained were compared with those deposited in the Bank of Genes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Because the fungus identified is not considered pathogenic of *S. bonplandiana*, from the monosporic culture obtained for identification, the isolate was expanded in the PDA growth medium to implement Koch's postulates (Agrios, 2005).

### Experimental design and variables measured

The experimental design was of complete randomized blocks with four blocks and six repetitions per block, and three treatments: T1 lesions in the epidermis inoculated with a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia of the pathogenic fungus  $\text{mL}^{-1}$  on branches of shrubs of *S. bonplandiana*; T2 lesions in the epidermis treated with sterile distilled water on branches of shrubs of *S. bonplandiana*; and T3 absolute control (plants without injury and without inoculation). The variables were the number of cankers developed in the lesions made and the time in days for their appearance. Data collection was done every three days.

de *S. bonplandiana*; T2) lesiones en la epidermis tratadas con agua destilada estéril en ramas de arbustos de *S. bonplandiana*; y T3) testigo absoluto (plantas sin lesiones y sin inoculación). Las variables fueron número de canchros desarrollados en las lesiones realizadas y tiempo en días para su aparición. La toma de datos se hizo cada tercer día.

### Pruebas de patogenicidad

Los arbustos de *S. bonplandiana* tenían un año de edad, desarrollados de estacas de 1.5 cm de diámetro en bolsas de polietileno (40×20 cm largo-ancho), y se mantuvieron en invernadero libres de plagas y con fertilización. Después de tres meses se interrumpió la dominancia apical para lograr el desarrollo de ramas, en las que se aplicaron los tratamientos. Cuando las ramas de sauce tuvieron 1 cm de diámetro, se seleccionaron dos por planta y con navaja se hicieron cinco lesiones de 1 cm longitud sobre la epidermis de cada rama. Después la navaja se lavó con agua destilada, se sumergió 2 min en hipoclorito de sodio al 2 % y se lavó con agua destilada estéril.

Para aplicar los primeros dos tratamientos se usaron hisopos de algodón estériles. En T1 el hisopo se sumergió en la suspensión de conidios homogeneizada y se frotó sobre la lesión; en T2 el hisopo se sumergió en agua destilada estéril y luego se frotó sobre la lesión. T3 fue el testigo absoluto.

### Reaislamiento del patógeno

De la zona de avance del síntoma del sitio inoculado se separaron cinco cortes de 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido, se lavaron con agua destilada y sumergieron en hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min; se lavaron dos veces consecutivas con agua destilada estéril y colocaron en papel desecante estéril. Cinco trozos se sembraron en cajas petri con PDA que se colocaron en una incubadora (Riossa®) a 25 °C. Las colonias del hongo desarrolladas en el medio de cultivo nuevamente se transfirieron a medio de cultivo PDA para su purificación e identificación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntomas y daño ocasionado por *Alternaria tenuissima*

Los síntomas registrados en ramas y ramillas de *S. bonplandiana* ocasionados por *A. tenuissima* fueron lesiones en forma de canchros de 1.5 a 2.0 cm de longitud por 1.0 cm de anchura, con abultamientos y tonalidad café oscura en los bordes y centro del mismo color; el daño inició en la epidermis y

### Pathogenicity tests

The *S. bonplandiana* bushes were one year of age, developed from cuttings of 1.5 cm in diameter in polyethylene bags (40×20 cm length-width) and were kept in a greenhouse free from pests and with fertilization. After three months, the apical dominance was interrupted to attain branch development, in which treatments were applied. When the willow branches were 1 cm in diameter, two per plant were selected and five lesions of 1 cm long were done on the epidermis of each branch with a knife. Then the knife was washed with distilled water, immersed 2 min in sodium hypochlorite at 2 % and washed with sterile distilled water.

To apply the first two treatments sterile cotton swabs were used. In T1 the swab was immersed in the conidial homogenized suspension and rubbed on the lesion; in T2 the swab was immersed in sterile distilled water and then rubbed on the injury. T3 was the absolute control.

### Reisolation of the pathogen

From the area of progress of the symptom from the inoculated site five sections of 0.5 cm<sup>2</sup> of tissue were separated, washed with distilled water and immersed in sodium hypochlorite at 2 % for 2 min; they were washed two consecutive times with sterile distilled water and placed on sterile desiccant paper. Five pieces were planted in Petri plates with PDA that were placed in an incubator (Riossa®) at 25 °C. The fungus colonies developed in the growth media were again transferred to the PDA growth medium for purification and identification.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Symptoms and damage caused by *Alternaria tenuissima*

The symptoms recorded in branches and twigs of *S. bonplandiana* caused by *A. tenuissima* were lesions in the form of canker of 1.5 to 2.0 cm long and 1.0 cm wide, with bumps and dark brown hue on the edges and center of the same color. The damage began in the epidermis and then invaded the phloem and vascular cambium to reach the xylem. Of these branches the epidermis was removed and the phloem remained exposed; the vascular cambium and xylem were damaged and stained and branches became brittle (Figure 1). Agrios (2005) mentions that the phytopathogenic fungi produce different symptoms in their hosts, like cankers, chlorotic and

luego invadió el floema y el cambium vascular hasta llegar al xilema. De estas ramas se retiró la epidermis y quedó expuesto el floema, cambium vascular y xilema dañado y manchado y se tornaron quebradizas (Figura 1). Agrios (2005) menciona que los hongos fitopatógenos producen en sus hospederos diferentes síntomas como canchros, manchas cloróticas y necróticas, cribados, tizones, podredumbres húmedas o secas, momificación, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas, entre otros.

El daño a la estética en ornamentales es determinante al comercializar el producto pues los síntomas por plagas o enfermedades en las flores y follaje reducen la calidad y en consecuencia su valor económico. No obstante, hay demanda creciente de varas cortadas de esta modalidad por lo que la fitosanidad es determinante para atender la demanda (González *et al.*, 1998). Este tipo de daño en sauce no se ha relacionado con la presencia de *A. tenuissima*; sin embargo *Alternaria* fue identificada, como causante de manchas foliares en *S. bomplandiana* en EE.UU. (Alfieri *et al.*, 1984). *A. tenuissima* ha sido identificada como agente

necrotic spots, screening, tailings, wet or dry rot, mummification, gills, dents, scabs, drowning, wilts and pustules, among others.

The damage to aesthetics in ornamentals is crucial when marketing the product because pest or disease symptoms in flowers and foliage reduce quality and therefore their economic value. However, there is increasing demand for cut sticks of this type, so that plant health is crucial to meet the demand (Gonzalez *et al.*, 1998). This type of damage in willows has not been associated with the presence of *A. tenuissima*; however *Alternaria* was found to cause leaf spots in *S. bonplandiana* in the United States (Alfieri *et al.*, 1984). *A. tenuissima* has been identified as a plant pathogen in the USA in plants of the genera *Amaranthus* sp., *Cajanus* sp., *Cichorium* sp., *Fragaria* sp., *Glycine* sp., *Lycopersicon* sp., *Nicotiana* sp., *Passiflora* sp., *Phaseolus* sp., *Pittosporum* sp., *Prunus* sp., *Santolina* sp., *Tragopogon* sp., *Vaccinium* sp. and *Viola* sp. (Farr *et al.*, 1989). In addition, it causes damage in pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*), strawberry (*Fragaria* spp.), pumpkin (*Cucurbita*

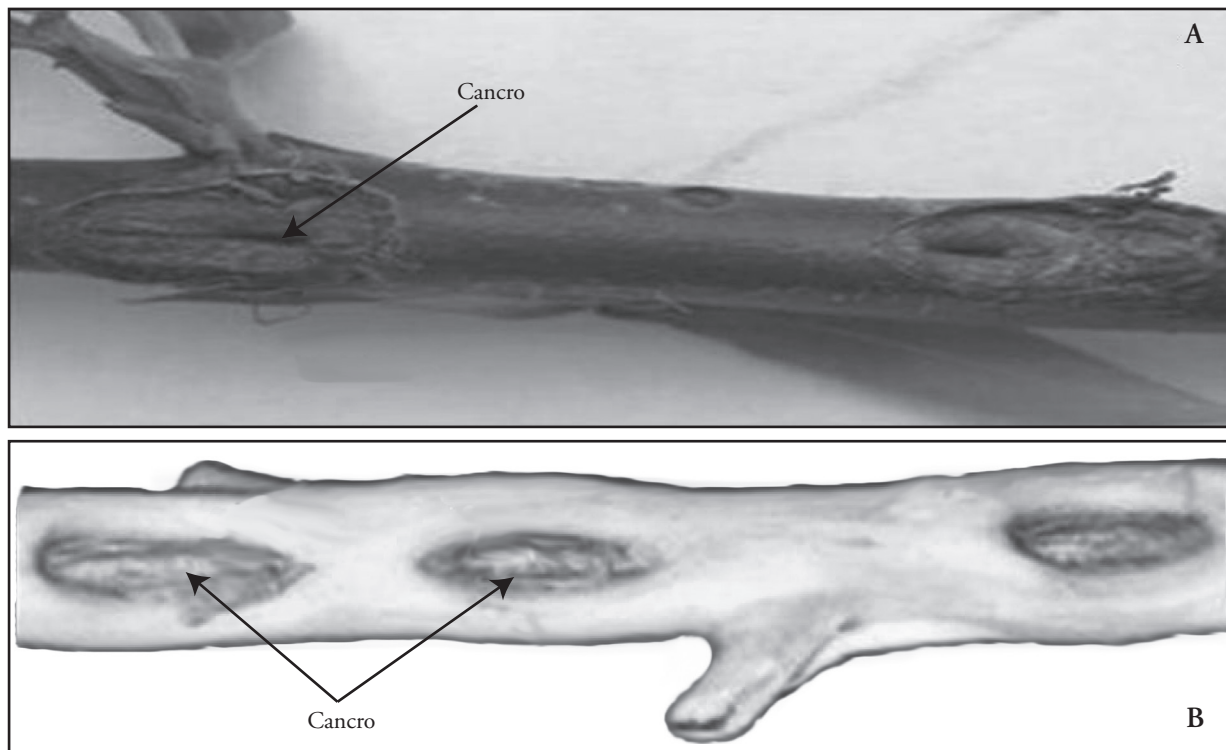


Figura 1. Daños ocasionadas por *Alternaria tenuissima* en ramas de *Salix bonplandiana*. A) cancro en ramilla verde; B) daños en ramilla seca sin epidermis.

Figure 1. Damage caused by *Alternaria tenuissima* in *Salix bonplandiana* branches. A) canker in green twig; B) damage in dry twig without epidermis.

fitopatógono en EE.UU. en plantas de los géneros *Amaranthus* sp., *Cajanus* sp., *Cichorium* sp., *Fragaria* sp., *Glycine* sp., *Lycopersicon* sp., *Nicotiana* sp., *Pasiflora* sp., *Phaseolus* sp., *Pitosporum* sp., *Prunus* sp., *Santolina* sp., *Tragopogon* sp., *Vaccinium* sp. y *Viola* sp. (Farr *et al.*, 1989). Además, causa daños en pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*), fresa (*Fragaria* spp.), calabaza de culebra (*Cucurbita* spp.), soya (*Glycine max* (L.) Merrill), gloria de la mañana, algodón (*Gossypium hirsutum* L.), chícharo (*Lathyrus odoratus* L.), gandú (*Cajanus cajan* (L.) millsp.), melón amargo (*Momordica charantia* L.), frijol capí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), trigo (*Triticum aestivum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), lunaria (*Lunaria annua* L.), flor terciopelo (*Celosia cristata* L.), chabacano (*Prunus armeniaca* L.) y haba (*Vicia faba* L.), (Rahman *et al.*, 2002); además, en chícharo (*Lathyrus odoratus* L.), (Nutsugah *et al.*, 1994), cítricos (Castro *et al.*, 1995), *Solanum khasianum* C.B. Clarke (Boruah *et al.*, 1999), quintonil (*Amaranthus hypochondriacus* L.), (Blodgett y Swart, 2002), *Coccinia indica* L., *Paris polyphylla* (pol-ee-FIL-uh) (Info) y *Potentilla fulgens* L. (Vijay *et al.*, 2001), tulsi (Bhadauria *et al.*, 2003) y berenjena (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt), (Raja *et al.*, 2006).

### Identificación del patógeno

Con base en las características morfológicas descritas a continuación el hongo fue identificado como *A. tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire (Neergaard, 1945; Ellis, 1971; Simmons, 1990; Simmons, 1999). Se observaron conidióforos solitarios o en grupos, simples o ramificados, rígidos o flexuosos, más o menos cilíndricos, septados, pálido o con la mitad pálido marrón, lisos, con una o varias cicatrices de conidios, mayores de 115  $\mu\text{m}$  de longitud, 4 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho; conidios solitarios o en cadenas cortas de 3 a 5 conidios rectos o curvos, obtuso clavado o con el cuerpo del conidio elipsoidal ahusado gradualmente hacia el pico casi hasta la mitad del conidio, usualmente corto, algunas veces afilado en la punta pero con frecuencia hinchado en el ápice en donde puede haber varias cicatrices, pálido con la mitad marrón oro pálido, generalmente liso, algunas veces minuciosamente verrugoso, generalmente con 4 a 7 septos transversales o varios septos longitudinales o levemente

spp.), soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), cotton (*Gossypium hirsutum* L.), pea (*Lathyrus odoratus* L.) gandú (*Cajanus cajan* (L.) millsp.), bitter melon (*Momordica charantia* L.), bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), wheat (*Triticum aestivum* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid), peanut (*Arachis hypogaea* L.), lunaria (*Lunaria annua* L.), velvet flower (*Celosia cristata* L.), apricot (*Prunus armeniaca* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.) (Rahman *et al.*, 2002); also in peas (*Pisum sativum* L.), (Nutsugah *et al.*, 1994), citrus (Castro *et al.*, 1995), *Solanum khasianum* C.B. Clarke (Boruah *et al.*, 1999), quintoniles (*Amaranthus hypochondriacus* L.) (Blodgett and Swart, 2002), *Coccinia indica* L., *Paris polyphylla* (pol-ee-FIL-uh) (Info) and *Potentilla fulgens* L. (Vijay *et al.*, 2001) tulsi (*Ocimum tenuiflorum* L.) (Bhadauria *et al.*, 2003) and eggplant (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) Sendt) (Raja *et al.*, 2006).

### Pathogen identification

Based on the morphological characteristics described below, the fungus was identified as *A. tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire (Neergaard, 1945; Ellis, 1971, Simmons 1990; Simmons, 1999). Conidiophores were observed alone or in groups, simple or branched, rigid or flexuous, more or less cylindrical, septate, pale or half pale brown, smooth, with one or more scars of conidia over 115  $\mu\text{m}$  in length, 4 to 6  $\mu\text{m}$  wide; solitary conidia or in short chains of 3 to 5 conidia straight or curved, blunt nailed or with the ellipsoidal conidium body tapering gradually towards the peak nearly up to the middle part of the conidium, usually short, sometimes tapered at the tip but often swollen at the apex, where there may be several scars, pale with one half pale golden brown, usually smooth, sometimes minutely verrucose, usually with 4 to 7 transverse septa or several longitudinal septa or slightly oblique, or constricted at the septa; of 22 to 95 (54)  $\mu\text{m}$  long, 8 to 9  $\mu\text{m}$  wide and 13.8  $\mu\text{m}$  in the wider area, with a peak of 2 to 4  $\mu\text{m}$  thick, with swollen appendix and 4 to 5  $\mu\text{m}$  wide. The morphological characteristics mentioned above distinguish this species of the 44 recognized species of the genus *Alternaria* (Ellis, 1971). According to Roten (1994), this species corresponds to the Brevicatenatae group for having short chains of 3 to 5 conidia with short

oblicuos, o constreñidos en los septos, de 22 a 95 (54)  $\mu\text{m}$  de longitud, 8 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 13.8  $\mu\text{m}$  en su región más amplia, con pico de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de grosor, con el apéndice hinchado y 4 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las características morfológicas señaladas distinguen a esta especie de las 44 especies reconocidas del género *Alternaria* (Ellis, 1971). De acuerdo con Roten (1994), esta especie corresponde al grupo Brevicatenatae por tener cadenas cortas de 3-5 conidios con cuellos cortos. La identificación taxonómica de *A. tenuissima* fue confirmada con 99 % de homología de la secuencia del DNAr-ITS, con número de acceso bankit1419070 HQ711617, y al compararla con la secuencia de *A. tenuissima* en el GenBank-NCBI (número de acceso DQ323698).

#### **Desarrollo de *Alternaria tenuissima* en medios de cultivo**

Los cinco medios de cultivos usados en el estudio propiciaron tiempos diferentes de esporulación. En PDA y HC la esporulación se observó 24 h después de incubadas las siembras a 25 °C; en ET se observó a los 24 d después. Singh *et al.* (2000) reportan esporulación en PDA, albumen más citrato de sodio y albumen más agua destilada, después de 18 h a 25  $\pm$  2 °C. Según Rahman *et al.* (2003), hay una gran cantidad de conidios en PDA con 6 d de cultivo y las primeras esporas después de 3 a 36 h en los medios de cultivo con extracto del hospedero. En contraste, en el presente estudio en el medio de cultivo con extracto de tallo de *S. bonplandiana*, el desarrollo de conidios se observó hasta 24 h después. Rahman *et al.* (2003) también observaron que en cultivo Czapek's las primeras esporas se formaron después de 40 h. Sin embargo, en las condiciones y durante el tiempo que duró el presente estudio, en el medio Czapek's sólo se observó el crecimiento de micelio; en EM las primeras esporas se observaron a las 24 h. Andersen *et al.* (2002) utilizaron este medio para estudios químicos y morfológicos de varias especies de *Alternaria*, entre ellas *A. tenuissima*, y los conidios fueron usados para el estudio después de 7 d de incubación a 25 °C, con ciclos alternos de luz fría (8 h) y oscuridad (16 h).

#### **Patogenicidad de *A. tenuissima***

En las lesiones de ramas de *S. bonplandiana* en las que se aplicó la suspensión de conidios los daños

necks. The taxonomic identification of *A. tenuissima* was confirmed with 99 % homology of the rDNA-ITS sequence with access number bankit1419070 HQ711617, and after comparing it with the sequence of *A. tenuissima* in the GenBank-NCBI (access number DQ323698).

#### **Development of *Alternaria tenuissima* in growth media**

The five growth media used in the study led to different times of sporulation. In PDA and HM sporulation was observed 24 h after plantings had incubated at 25 °C; in ET it was observed 24 d after. Singh *et al.* (2000) reported sporulation in PDA, albumen plus sodium citrate and albumen plus distilled water after 18 h at 25  $\pm$  2 °C. According to Rahman *et al.* (2003), there is a large amount of conidia on PDA with 6 d of culture and the first spores appeared after 3 to 36 h in the growth media with host extract. In contrast, in the present study, in the growth medium with stem extract of *S. bonplandiana*, the development of conidia was observed 24 h after. Rahman *et al.* (2003) also noted that in the Czapek's culture the first spores were formed after 40 h. However, in the conditions of the present study and during its time of duration, in the Czapek's medium only the growth of mycelium was observed; in EM the first spores were observed after 24 h. Andersen *et al.* (2002) used this medium for chemical and morphological studies of several *Alternaria* species, including *A. tenuissima*; and conidia were used for studies after 7 d of incubation at 25 °C with alternate cycles of cold light (8 h) and darkness (16 h).

#### **Pathogenicity of *A. tenuissima***

In lesions of branches of *S. bonplandiana* in which the conidia suspension was applied, damage appeared 11 d after inoculation. Rotem (1994) indicates that several pathogenic species of *Alternaria* can penetrate the cuticle and epidermis directly, but others enter through the stomata or wounds. Similarly Skiles (1953) mention that the wounds are necessary to produce infection by *A. alternata* and *A. tenuissima* in onion leaves. Also, Shortt *et al.* (1982) indicate that the infection of *A. tenuissima* in pods of soybean is associated with the feeding damage



se mostraron 11 d después de la inoculación. Rotem (1994) indica que varias especies patogénicas de *Alternaria* pueden penetrar la cutícula y epidermis directamente, pero otras entran a través de estomas o heridas. Similarmente Skiles (1953) menciona que las heridas son necesarias para que se produzca la infección por *A. alternata* y *A. tenuissima* en hojas de cebolla. Asimismo, Shortt *et al.* (1982) señalan que la infección de *A. tenuissima* en vainas de soya está asociada a los daños por alimentación del escarabajo *Cerotoma trifurcata* Forster. En contraste, Blodgett y Swart (2002) indican que *A. tenuissima* infecta y coloniza las hojas de *Amaranthus hybridus* L. penetrando por los estomas sin requerir de heridas para ello. Los resultados derivados de la presente investigación concuerdan con los reportados por Rotem (1994), Skiles (1953) y Shortt *et al.* (1982), ya que sólo en las ramas donde se realizaron heridas se observó el desarrollo de síntomas, como la cancrrosis, producidos por la infección y colonización de *A. tenuissima* en las ramas. Según Thomma (2003), *A. tenuissima* produce toxinas específicas en sus hospederos que puede ser la razón de la formación del cancro en sauce. Los síntomas desarrollados en las heridas inoculadas con agua destilada estéril pudo deberse a que *A. tenuissima* es un hongo endofítico extremadamente común en el ambiente, cuyos conidios pueden permanecer latentes sobre el hospedero hasta que las condiciones sean propicias para infectar (Blodgett y Swart, 2002). En las ramas correspondientes a T3 no se observaron síntomas de la enfermedad durante el periodo de estudio. Los síntomas de la cancrrosis en las lesiones inoculadas con la suspensión de conidios ocurrió después de 11 d de la inoculación (DDI) y se manifestó en 48.3 % de las heridas. En contraste sólo 8.3 % de lesiones inoculadas con agua destilada estéril presentaron síntomas (Figura 2). Sin embargo, Rahman *et al.* (2003) observaron desarrollo de lesiones 72 h después de inocular la suspensión de esporas germinadas de *A. tenuissima* sobre hojas de haba. En T1 (lesiones inoculadas con el hongo) el desarrollo de síntomas sucedió 29, 31 y 33 DDI, en 94.2, 95.8 y 97.5 % de las heridas inoculadas, mientras que en T2 (lesiones tratadas con agua estéril) las heridas con desarrollo de síntomas fue 72.5, 80 y 81.7 % (Figura 2).

En todas las fechas de muestreo hubo diferencias significativas en el número de lesiones que desarrollaron los síntomas de cancrrosis por *A. tenuissima* (Cuadro 1). En los muestreos 11, 13 y 15 DDI las diferencias

caused by the beetle *Cerotoma trifurcata* Forster. In contrast, Blodgett and Swart (2002) indicate that *A. tenuissima* infects and colonizes the leaves of *Amaranthus hybridus* L. penetrating through stomata without requiring wounds for doing so. The results from this study are consistent with those reported by Rotem (1994), Skiles (1953) and Shortt *et al.* (1982), since only in the branches where wounds were made, symptoms like canker were observed, caused by the infection and colonization of *A. tenuissima* on the branches. According to Thomma (2003), *A. tenuissima* produces specific toxins on their hosts, which can be the reason for the formation of canker on willow. The symptoms developed in wounds inoculated with sterile distilled water could be due to the fact that *A. tenuissima* is an extremely common endophytic fungus in the environment, whose conidia can remain dormant on the host until conditions are conducive to infect (Blodgett and Swart, 2002). The branches corresponding to T3 showed no symptoms of the disease during the study period. The symptoms of canker in the lesions inoculated with the conidia suspension were observed 11 d after inoculation (DAI) and appeared in 48.3 % of injuries. In contrast, only 8.3 % of the lesions inoculated with sterile distilled water showed symptoms (Figure 2). However, Rahman *et al.* (2003) observed development of lesions 72 h after the inoculation of the suspension of *A. tenuissima* germinated spores on broad bean leaves. In T1 (lesions inoculated with the fungus) the development of symptoms occurred 29, 31 and 33 DAI, in 94.2, 95.8 and 97.5 % of the wounds inoculated, while in T2 (lesions treated with sterile water) symptoms developed in 72.5, 80 and 81.7 % of the injuries (Figure 2).

In all sampling dates there were significant differences in the number of lesions that developed symptoms of canker from *A. tenuissima* (Table 1). In samplings 11, 13 and 15 DAI the differences between T2 and T3 were not significant ( $p > 0.05$ ) but they were significant ( $p \leq 0.05$ ) respect to the highest (in T1). Same tendency was observed during the others sampling dates (Table 1)

## CONCLUSIONS

Koch's postulates enabled to show the same symptoms in lesions of branches inoculated

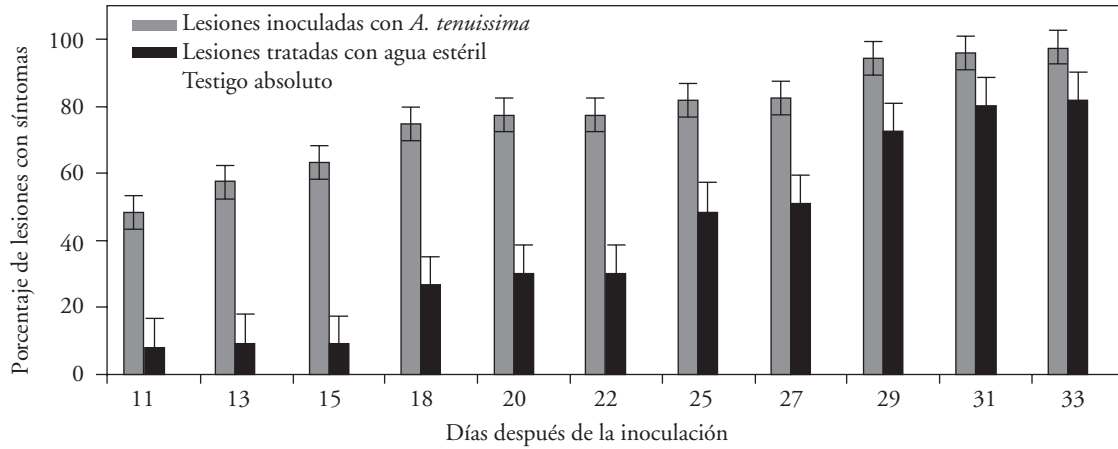


Figura 2. Desarrollo de canchros en lesiones superficiales de ramas de *Salix bonplandiana* inoculadas con una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios de *A. tenuissima*  $\text{mL}^{-1}$  o agua destilada estéril. Barras  $\pm$  error estándar;  $n=24$ .

Figure 2. Development of cankers in superficial lesions of *Salix bonplandiana* branches inoculated with a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia of *A. tenuissima*  $\text{mL}^{-1}$  or sterile distilled water.  $\pm$  standard error bars;  $n=24$ .

Cuadro 1. Número medio de lesiones con desarrollo de canchros en ramas de *Salix bonplandiana* ocasionada por *Alternaria tenuissima*.

Table 1. Average number of injuries with development of cankers on branches of *Salix bonplandiana* caused by *Alternaria tenuissima*.

Tratamientos	Días después de la inoculación										
	11	13	15	18	20	22	25	27	29	31	33
T1 <sup>†</sup>	2.4a	2.4a	2.4a	3.8a	3.9a	3.9a	4.1a	4.1a	4.7a	4.8a	4.9a
T2 <sup>‡</sup>	0.4b	0.4b	0.4b	1.3b	1.5b	1.5b	2.4b	2.5b	3.6b	4.0b	4.1b
T3 <sup>§</sup>	0.0b	0.0b	0.0b	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c	0.0c

Medias con distinta letra en una columna son diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letter in a column are different ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>†</sup> Inoculación de *A. tenuissima* en una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  sobre lesiones en la epidermis de ramas de arbustos de *S. bonplandiana* ♦ inoculation of *A. tenuissima* in a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  on epidermis lesions of branches of *S. bonplandiana* shrubs.

<sup>‡</sup> Agua destilada estéril sobre lesiones en la epidermis de ramas de arbustos de *S. bonplandiana* ♦ Sterile distilled water on the epidermis lesions of branches of *S. bonplandiana* shrubs.

<sup>§</sup> Testigo absoluto, plantas sin lesiones y sin inoculación ♦ Absolute control, plants without injury and without inoculation.

entre T2 y T3 no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) pero sí lo fueron ( $p \leq 0.05$ ) respecto a las más altas (en T1). La misma tendencia se mantuvo durante las otras fechas de muestreo (Cuadro 1).

### CONCLUSIONES

Los postulados de Koch permitieron mostrar los mismos síntomas en lesiones de ramas inoculadas con una solución de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  del hongo *Alternaria tenuissima*. Entonces hay evidencias

with a solution of  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of the fungus *Alternaria tenuissima*. Therefore there is sufficient evidence to propose that canker in *Salix bonplandiana* branches is caused by this fungus. This study is the first report describing the symptoms and pathogenicity of *Alternaria tenuissima* on *Salix bonplandiana*.

—End of the English version—

—\*—

suficientes para proponer que la cancrrosis en ramas de *Salix bonplandiana* es causada por este hongo. El presente estudio es el primer reporte que describe los síntomas y patogenicidad de *Alternaria tenuissima* sobre *Salix bonplandiana*.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G., N. 2005. Plant Pathology (5th ed.), Elsevier Academic Press, Burlington, MA. 922 p.
- Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Alfieri, S. A. Jr., K. R. Langdon, C. Wehlburg, and J. C. Kimbrough. 1984. Index of Plant Diseases in Florida. Florida Dept. of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Florida, USA. 389 p.
- Andersen, B., E. Kroger, and R. G. Roberts. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* 106: 170-182.
- Anselmi, N., A. Mazzaglia, and A. Giorcelli, 2006. Enfermedades de salicáceas. *Actas Jornadas de Salicáceas* pp: 42-60. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/forestacion/biblos/JS%202006/pdf%20tt/Anselmi.pdf>. (Consultado: septiembre del 2009).
- Bhadauria, S., B. S. Kushwah., D. Goyal, and K. P. Singh. 2003. Growth performance and fungal infestation under low temperature in Neem and Tulsi. *J. Agrometeorol.* 6: 132-135.
- Blodgett, J. T., and W. T. Swart. 2002. Infection, colonization and disease of *Amaranthus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. *Plant Dis.* 86: 1199-1205.
- Boruah, P., P. D. Bhuyan, and B. P. Misra. 1999. Evaluation of fungicides against *Alternaria tenuissima* causing leaf blight of steroidal *Solanum khasianum*. *Adv. For. Res. in India* 20: 203-210.
- Bridge, P. D., and D. K. Arora. 2000. Interpretation of PCR methods for species definition. *In*: Bridge, P. D., D. K. Arora, C. A. Reddy, and R. P. Elander (eds). *Applications of PCR in Micology*. Surrey, UK. CAB International. pp: 63-84.
- Castro, B. L., E. Leguizamo J., y A. López J. 1995. Determinación del agente causal de la mancha foliar de los cítricos *Alternaria tenuissima* en la zona cafetera colombiana. *Fitopatol. Colombiana* 19: 31-35.
- Ellis, M. B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. pp: 471-497.
- Farr, D. F., G. F. Bills., G.P. Chamuris, and A. Y. Ossman. 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. APS Press. Minnesota, USA. 1252 p.
- Gonzalez, A., A. Baño., y J. A. Fernandez, 1998. *Cultivos Ornamentales para Complementos del Ramo de Flor*. Mundi-Prensa. España. 228 p.
- Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry, e I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F. CIMMYT. 68 p.
- Hunter, T., and K. G. Stott. 1978. A disease of *Salix alba* var. *coerulea* caused by a fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Pathol.* 27: 144-145.
- Neergaard, P. 1945. *Danish Species of Alternaria and Stemphylium*. Oxford University Press. London, England. 560 p.
- Nejad, P., M. Ramstedt, and U. Granhall. 2004. Pathogenic ice-nucleation active bacteria in willows for short rotation forestry. *For. Pathol.* 34: 369-381.
- Nutsuga, S. K., K. Kohmoto, H. Otani, M. Kodama, and R.R. Sunkeswari. 1994. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. *J. Phytopathol.* 140: 19-30.
- Ostry, M. E., and N. A. Anderson. 2001. *Melampsora* leaf rust of willow causing a stem canker in Minnesota. *Plant Dis.* 85: 229-229.
- Quintero R., y B. Villa A. 1991. Evaluación dosométrica, fenológica y sanitaria del ahuejote, *Salix bonplandiana* H. B. K., en el área chinampera de Xochimilco, D. F. *Revista Ciencia For. Méx.* 16: 39-67.
- Rahman, M. Z., Y. Honda, and S. Arase. 2003. Red-light-induced resistance in broad vena (*Vicia faba* L.) to leaf spot disease caused by *Alternaria tenuissima*. *J. Phytopathol.* 151: 86-91.
- Rahman, M. Z., Y. Honda, S. Z. Islam, N. Muroguchi, and S. Arase. 2002. Leaf spot disease of broad bean (*Vicia faba* L.) caused by *Alternaria tenuissima* a new disease in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 31-37.
- Raja, P., A. V. R. Reddy, and U. S. Allam. 2006. First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot and fruit rot on eggplant (*Solanum melongena*) in India. *Plant Pathol.* 55: 579-579.
- Rotem, J. 1994. *The Genus Alternaria. Biology, Epidemiology and Pathology*. APS Press. Minnesota, USA. 326 p.
- Sakamoto, Y., Y. Takikawa, and K. Sasaki. 1999. Occurrence of watermark disease of willows in Japan. *Plant Pathol.* 48: 613-619.
- Shing, P., K. Shing, and K. Sarma. 2000. Time-dependent sporulation, conidial size and germ tube formation in *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers) wiltshire on different media. *J. Phytopathol.* 148: 413-416.
- Shortt, B. J., J. B. Sinclair, C. G. Helm, M. R. Jeffords, and M. Kogan. 1982. Soybean seed quality losses associated with bean leaf beetles and *Alternaria tenuissima*. *Phytopathol.* 72(6): 615-618.
- Simmons, E.G. 1990. *Alternaria* themes and variation. *Mycotaxon* 37: 79-119.
- Simmons, E.G. 1999. *Alternaria* themes and variation. Host-specific toxin producers. *Mycotaxon* 70: 325-369.
- Skiles, R. L. 1953. Purple and brown blotch of onions. *Phytopathol.* 43: 409-412.
- Spiers, A. G., and D. H. Hopcroft. 1993. Black canker and leaf spot of *Salix* in New Zealand caused by *Glomerella myabeana* (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Eur. J. For. Pathol.* 23: 92-102.
- Thomma, B. 2003. Pathogen profile: *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4:225-236.
- Vijay, K., K. N. Pandey, and G. C. Joshi. 2001. Three new host records for *Alternaria tenuissima*. *Indian Phytopathol.* 54: 400-400.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Inns, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds). PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California. USA. pp: 315-322.