

Morphological and molecular identification of *Mortierella* species associated to rhizosphere of apple trees with symptoms of root diseases

Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares

Yericka Mares-Ponce de León, Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, *Campus* Universitario #2, Circuito Universitario, Chihuahua. CP. 31125, Chihuahua, Chihuahua, México; María Fernanda Ruiz-Cisneros, Daniel Alonso Pérez-Corral, José de Jesús Ornelas-Paz, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, David Ignacio Berlanga-Reyes, Claudio Rios-Velasco*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc. Avenida Río Conchos S/N. Parque Industrial, CP. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 09 de Octubre, 2017.

Aceptado: 13 de Diciembre, 2017.

Mares-Ponce de León Y, Muñoz-Castellanos LN, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Berlanga-Reyes DI, Rios-Velasco C. 2017. Morphological and molecular identification of *Mortierella* species associated to rhizosphere of apple trees with symptoms of root diseases. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1) 184-195.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-2

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 27, 2017.

Resumen. Se aislaron especies de *Mortierella* en Agar Dextrosa Papa y agar V8, así como peras maduras y hojas de azalea, como sustratos trampa. Se obtuvieron 419 aislados de *Mortierella*, de muestras de suelo en Chihuahua, México, los cuales se clasificaron en 21 grupos de acuerdo con sus caracteres morfológicos. *Mortierella* se aisló con mayor

Abstract. *Mortierella* species were isolated on Potato Dextrose Agar and V8-agar as well as mature pear fruits and azalea leaves as substrate baits. Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were obtained from soil samples in Chihuahua, Mexico which were classified into 21 groups, according to their morphological characters. *Mortierella* was isolated more frequently when pear fruits were used, obtaining 143 isolates (34.1%), followed by the V8-agar-antibiotics medium with 133 isolates (31.7%), and azalea leaves with 95 isolates (22.7%). An isolate from each of the 21 groups was identified molecularly, 12 corresponded to *Mortierella alpina*, one to *M. gamsii*, one to *M. capitata*, and six to *Mortierella* sp., and one belonged to the Mortierelliales order. In addition, the putative pathogenicity of the 21 *Mortierella* isolates identified was tested in G30

frecuencia cuando se emplearon peras, obteniendo 143 aislados (34.1%), seguido del agar V8-antibióticos con 133 aislados (31.7%) y las hojas de azalea, con 95 aislados (22.7%). Se identificó molecularmente un aislado de cada uno de los 21 grupos, 12 correspondieron a *Mortierella alpina*, uno a *M. gamsii*, uno a *M. capitata* y seis a *Mortierella* sp. y uno perteneció al orden Mortierelliales. Adicionalmente se probó la patogenicidad putativa de los 21 aislados de *Mortierella* identificados, en porta injertos de manzana G30 bajo condiciones de invernadero y ninguno fue patogénico. Estas especies no habían sido reportadas previamente en México. El estudio demostró que existen especies de *Mortierella* en la rizosfera de manzanos en Chihuahua, México. Estas podrían producir ácidos grasos poliinsaturados y ejercer efectos elicitors en cultivos hortofrutícolas confiriéndoles resistencia a múltiples patógenos.

Palabras clave: Mortierellales, diversidad, sustratos trampa, medio de aislamiento, patogenicidad.

Se estima que solo un 5% de las especies fúngicas existentes han sido registradas y descritas (Hawksworth, 2001). Mortierelliales es uno de los órdenes más abundantes y diversos de los hongos basales y hay cerca de 100 especies descritas en 13 géneros de la familia Mortierellaceae (Yadav *et al.*, 2014), género al cual corresponde el hongo *Mortierella*. La mayoría de las especies de este género producen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al convertir el exceso de azúcares y otras fuentes de carbón en lípidos bajo diferentes condiciones de fermentación (Rayaroth *et al.*, 2016). En varios estudios se ha demostrado que algunas especies de *Mortierella* pueden acumular ácidos araquidónico, gamma-linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico en el micelio (Ho *et al.*,

apple rootstocks under greenhouse conditions and none was pathogenic. These species have not been reported previously in Mexico. The study showed that there are *Mortierella* species in the rhizosphere of apple trees in Chihuahua Mexico. These fungal isolates might produce polyunsaturated fatty acids and exert effects of elicitation in horticultural plants and fruit trees improving their resistance to multiple pathogens.

Key words: Mortierellales, diversity, substrate baits, isolation medium, pathogenicity.

It has been estimated that only 5% of the existing fungi species have been recorded and described (Hawksworth, 2001). The Mortierellales is one of the most abundant and diverse orders of basal fungi, with nearly 100 species described into 13 genera of the Mortierellaceae family (Yadav *et al.*, 2014), in which the *Mortierella* genus is located. Most of species of this genus are able to produce polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by converting excess of sugars and other carbon sources into lipids under different fermentation conditions (Rayaroth *et al.*, 2016). Several studies have shown that some *Mortierella* species are able to accumulate arachidonic, γ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the mycelium (Ho *et al.*, 2007; Dedyukhina *et al.*, 2014). These compounds are involved in induction of resistance to phytopathogens in plants of agricultural importance (Zlotek and Wojcik, 2014). Additionally, these PUFAs are widely used as food supplements and drugs to improve the immune response in humans, giving technological importance to the *Mortierella* genus as an alternative source of these compounds (Dedyukhina *et al.*, 2014). However, existing information about the diversity of Mortierellales is limited or out of date. The identification of

2007; Dedyukhina *et al.*, 2014). Estos compuestos están involucrados en la inducción de resistencia a fitopatógenos en plantas de importancia agrícola (Zlotek and Wojcik, 2014). Asimismo, estos PUFA son ampliamente utilizados como suplementos alimenticios y fármacos que mejoran la respuesta inmunológica en los seres humanos, lo cual confiere importancia tecnológica al género *Mortierella* como fuente alternativa de dichos compuestos (Dedyukhina *et al.*, 2014). Sin embargo, existe información escasa u obsoleta acerca de la diversidad de los Mortierellales. La identificación de las especies de *Mortierella* se ha basado principalmente en sus caracteres morfológicos (Watanabe, 2010). Además, la identidad de las especies de estos hongos mediante técnicas moleculares ha recibido poca atención, sobre todo en México, donde actualmente existe un gran interés por encontrar microorganismos antagónicos para el control de fitopatógenos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar especies nativas de *Mortierella* asociadas con manzanos con síntomas aparentes de enfermedades radiculares.

De junio a julio de 2015, se muestrearon tres huertas de manzanos (*Malus x domestica* Borkh. Rosales: Rosaceae) en las cuatro zonas productoras de manzana más importantes: Cuauhtémoc, Guerrero, Bachiniva y Namiquipa, Chihuahua, México (Cuadro 1). Se recolectaron muestras de suelo (500-600 g) de la rizosfera de cinco árboles con síntomas aparentes de enfermedades radiculares causadas por hongos y oomicetos en cada huerto (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Para aislar las cepas de *Mortierella* se utilizaron dos medios de cultivo (Agar Dextrosa Papa y agar V8). Los medios agar-dextrosa-papa (PDA; BD Bioxon) y agar V8 [jugo V8, carbonato de calcio (CaCO₃) - agar] contenían antibióticos [oxitetraciclina, 0.01 g/L; rifampicina, 0.03 g/L; pimarcina, 0.01 g/L, y 66.8 µL/L de un formulado fungicida

Mortierella species has mainly been based on morphological characters (Watanabe, 2010). Besides, the identity of species of this fungi by molecular techniques has received little attention, especially in México, where currently there is a high interest to find out antagonistic microorganisms to control phytopathogens. Thus, the aim of the study was to isolate and identify native *Mortierella* species associated to apple trees with apparent symptoms of root diseases.

Three apple orchards (*Malus x domestica* Borkh. Rosales: Rosaceae) were sampled from June through July of 2015 in the four most important apple-producing areas: Cuauhtémoc, Guerrero, Bachiniva and Namiquipa, Chihuahua, Mexico (Table 1). Soil samples (500-600 g) were collected from the rhizosphere of five trees with apparent symptoms of root diseases caused by fungi and Oomycetes in each orchard (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Two culture media (Potato Dextrose Agar and V8-agar) were used for the isolation of *Mortierella* strains. The potato-dextrose-agar (PDA; BD Bioxon) and V8-agar [V8 juice, calcium carbonate (CaCO₃) - agar], media contained antibiotics [oxytetracycline, 0.01 g/L; rifampicin, 0.03 g/L; piramicin, 0.01 g/L, and 66.8 µL/L of the fungicidal hymexazol formulated (Summit Agro, México)]. The isolation of *Mortierella* strains on V8-agar was performed with and without pear fruits (*Pyrus communis* L.) and azalea leaves (*Rhododendron simsii* Planch.) as bait substrates. For isolation on PDA and V8-agar without bait substrates, serial dilutions (1:10) were performed in test tubes containing 9 mL of sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl in distilled water) by adding 1 g of soil previously sieved, to generate 10³, 10⁴ and 10⁵ dilutions. Aliquots (50 µL) of each suspension were spread in triplicate on 90-mm Petri dishes containing one of the two media,

Cuadro 1. Localidad donde se recolectaron muestras de suelo rizosférico en huertos de manzana en Chihuahua, México, en 2015.
Table 1. Location of apple orchards where samples of rhizosphere soil were collected in Chihuahua, Mexico, in 2015.

Localidad	Huerto	Localización geográfica	Altitud
Cuauhtémoc	Campo 2A	N28°26'40"; O106°59'18"	2,130
	Campana 4 ½	N28°33'49"; O106°54'24"	1,995
	Picacho	N28°29'28"; O 106°40'08"	2,020
Guerrero	Alberto Gameros	N28°31'58"; O 107°26'57"	2,096
	Alberto Gameros PIG30	N28°31'58"; O 107°26'57"	2,096
	Efraín Sandoval	N28°32'59"; O 107°27'10"	2,099
Namiquipa	Carlos Márquez	N29°11'20"; O 107°25'14"	1,877
	San Rafael	N29°12'19"; O 107°25'22"	1,858
	El Terrero	N29°18'84"; O107°44'21"	2,037
Bachiniva	La Cienega	N28°46'52"; O 107°15'21"	2,009
	Santa Rosa	N28°50'17"; O 107°14'12"	1,989
	Los 40	N28°48'07"; O 107°16'06"	1,990

con hymexazol (Summit Agro, México]. El aislamiento de cepas de *Mortierella* en agar V8 se llevó a cabo con y sin frutos de pera (*Pyrus communis* L.) y hojas de azalea (*Rhododendron simsii* Planch.) como sustratos trampa. Para el aislamiento en PDA y agar V8 sin sustratos trampa, se prepararon diluciones seriadas (1:10) en tubos de ensayo con 9 mL de agua estéril de peptona (peptona al 0.1% y NaCl al 0.85% en agua destilada), a las que se agregó 1 g de suelo previamente tamizado para generar diluciones de 10^3 , 10^4 y 10^5 . Utilizando la técnica de difusión, las alícuotas (50 μ L) de cada suspensión se distribuyeron por triplicado en cajas de Petri de 90 mm que contenían uno de los medios. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a 28 ± 1 °C por 72 h en una cámara ambiental sin luz (Precision Scientific, Winchester, VA, EUA). Para aislar las cepas de *Mortierella* utilizando frutos de pera como sustrato trampa, se colocaron 200-250 g de suelo húmedo en vasos de plástico de 1 L con tapa que contenían una pera previamente lavada con NaClO al 1.5% por 1 min. Los vasos fueron incubados a 26 ± 1 °C en oscuridad por 72 h. En seguida, los frutos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril

using a diffusion technique. The Petri dishes were subsequently incubated at 28 ± 1 °C for 72 h in an environmental chamber without light (Precision Scientific, Winchester, VA, USA). For isolation of *Mortierella* strains using pear fruits as bait substrate, 200-250 g of moistened soil were placed in 1 L plastic cups with a lid, containing one pear that had been previously washed with 1.5% NaClO for 1 min. The cups were incubated at 26 ± 1 °C in darkness for 72 h. Then, the fruits were rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile brown paper in a biosafety hood (Envirco Corporation, Albuquerque, USA). The fruits were individually incubated at 26 ± 1 °C for 48 h. Three sections (5 mm²) of damaged epidermis (transition zone) or mycelium-containing epidermis, were excised from the fruit and placed on Petri dishes containing V8-agar with antibiotics. The dishes were incubated at 26 ± 1 °C for 72 h. For the isolation using azalea leaves as bait substrate, fresh young leaves were treated in the same way than pear fruits. The leaves were cut in circles of 5 mm of diameter. The circles were placed on Petri dishes (60 × 15 mm) containing 10-15 g of moistened

y se secaron en papel de estraza en una campana de bioseguridad (Enviroco Corporation, Albuquerque, EUA). Los frutos fueron incubados de manera individual a 26 ± 1 °C por 48 h. Se extirparon tres secciones (5 mm^2) de la epidermis dañada del fruto (zona de transición), o de la epidermis con micelio, y se colocaron en cajas de Petri que contenían agar V8 con antibióticos. Las cajas se incubaron a 26 ± 1 °C por 72 h. Para el aislamiento con hojas de azalea como sustrato trampa, se utilizaron hojas jóvenes y frescas que fueron sometidas al mismo tratamiento que los frutos de pera. Las hojas se cortaron en círculos de 5 mm de diámetro. Los círculos se colocaron en cajas de Petri ($60 \times 15 \text{ mm}$) que contenían 10-15 g de suelo húmedo y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Los círculos de las hojas se desprendieron de la caja, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en papel de estraza. Los círculos se colocaron en los cuatro puntos cardinales y en el centro de las cajas de Petri que contenían agar V8 con antibióticos y se incubaron a 28 ± 1 °C por 72 h. Estos experimentos se hicieron por triplicado.

Las colonias con morfología típica de *Mortierella* se aislaron y purificaron en los medios agar V8 o PDA sin antibióticos, aplicando la técnica de cultivo monospórico, y se incubaron a 28 ± 1 °C sin luz por 120 h.

Los aislados putativos de Mortierellales fueron agrupados según sus caracteres morfológicos macroscópicos y después se tomó un aislado de cada grupo para su identificación (Watanabe, 2010), de acuerdo con los caracteres microscópicos observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Germany).

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó de acuerdo con el método de Raeder y Broda (1985) y Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). El ADNg se utilizó para amplificar la región espaciadora interna

soil and incubated at room temperature for 24 h. The leaf circles were removed, washed with sterile distilled water and dried on sterile brown paper. Leaf circles were placed in the four cardinal points and center of Petri dishes containing V8-agar with antibiotics and incubated at 28 ± 1 °C for 72 h. These experiments were performed in triplicate.

The colonies with typical morphology of *Mortierella* were isolated and purified on V8-agar or PDA medium without antibiotics, using a monosporic culture technique followed by incubation at 28 ± 1 °C, without light for 120 h.

Putative Mortierellales isolates were grouped according to their macroscopic morphological characters and then an isolate of each group was taken for identification (Watanabe, 2010) according to its microscopic characters seen at an optical microscope (Carl Zeiss, Germany).

Genomic DNA (gDNA) was extracted according to Raeder and Broda (1985) and Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). This gDNA was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of 18S rDNA gene using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). The amplification was performed according to the methodology described by Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). The PCR products were examined by electrophoresis on a 1% agarose gel. Subsequently, these products were sequenced at MacroGen Company (Rockville, MD, USA). The obtained sequences were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity corresponding to the analyzed species. Additionally, a phylogenetic tree by maximum likelihood method, to observe the grouping of Mortierellales fungi was constructed, using Mega software version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

transcrita (ITS) del gen 18S ADNr con iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, los productos fueron secuenciados por Macrogen Company (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies analizadas. Además, se construyó un árbol filogenético, por el método de máxima verosimilitud, a fin de observar el agrupamiento de los hongos Mortierellales, para lo cual se utilizó el software Mega versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

La patogenicidad de los 21 aislados de *Mortierella* se probó en porta injertos de manzana G30 (una de las que más se producen en México) en condiciones de invernadero, según el método de Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) con modificaciones. Se evaluaron 10 porta injertos G30 (de 1 año de edad) por cada aislado de *Mortierella*, junto con diez árboles de testigo (sin inóculo). Dos meses después de la plantación, cada árbol fue inoculado con 10 mL de inóculo de *Mortierella* no cuantificado. El inóculo, de 6-7 días de edad, se sembró en jugo de verduras V8 [jugo V8 (Campbell's™) y carbonato de calcio (CaCO₃)], y se mantuvo a 28 °C con agitación orbital constante a 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Posteriormente, los porta injertos inoculados se mantuvieron dos meses más en condiciones de invernadero y durante este periodo fueron monitoreados cada semana.

Se obtuvieron 119 aislados de *Mortierella* de las muestras de suelo evaluadas (Cuadro 1, Figura 1a-b). El uso de frutos de pera como sustrato

The pathogenicity of 21 *Mortierella* strains was tested in G30 apple rootstocks (one of the most planted in Mexico) under greenhouse conditions, according to Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) with modifications. Ten G30 rootstocks (1 year old) were tested for each *Mortierella* strain, along with ten control trees (without inoculum). Two months after planting, each tree was inoculated with 10 mL of unquantified *Mortierella* inoculum. The inoculum was 6-7 d old, grown in vegetable broth V8 [V8 juice (Campbell's™) and calcium carbonate (CaCO₃)] and maintained at 28 °C with constant orbital shaking at 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Subsequently, the inoculated rootstocks were maintained for another two months under greenhouse conditions and during this time were monitored weekly.

Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were obtained from tested soil samples (Table 1, Figure 1a-b). The use of pear fruits as bait substrate allowed to obtain the highest number of isolates (143 isolates, 34.1%), followed by the V8-agar-antibiotics medium (133 isolates, 31.7%) and the method involving leaves of azalea as bait substrate (95 isolates, 22.7%). The least effective isolation method was the PDA-antibiotics medium (48 isolates, 11.5%) (Figure 1a). The high number of isolated microorganisms using pear fruits might be consequence of a higher contact area of this fruits with soil, and longer exposure. Azalea leaves and mature fruits have been used as bait substrates to isolate other microorganisms with favorable results. In contrast to our results, Yadav *et al.* (2014) efficiently isolated *Mortierella alpina* on PDA medium.

The number of *Mortierella* isolates obtained from each region is shown in Figure 1b. The highest number of isolates (136, 32%) was obtained from the Cuauhtémoc area. Webster and Weber (2007) demonstrated that the isolation frequency for each

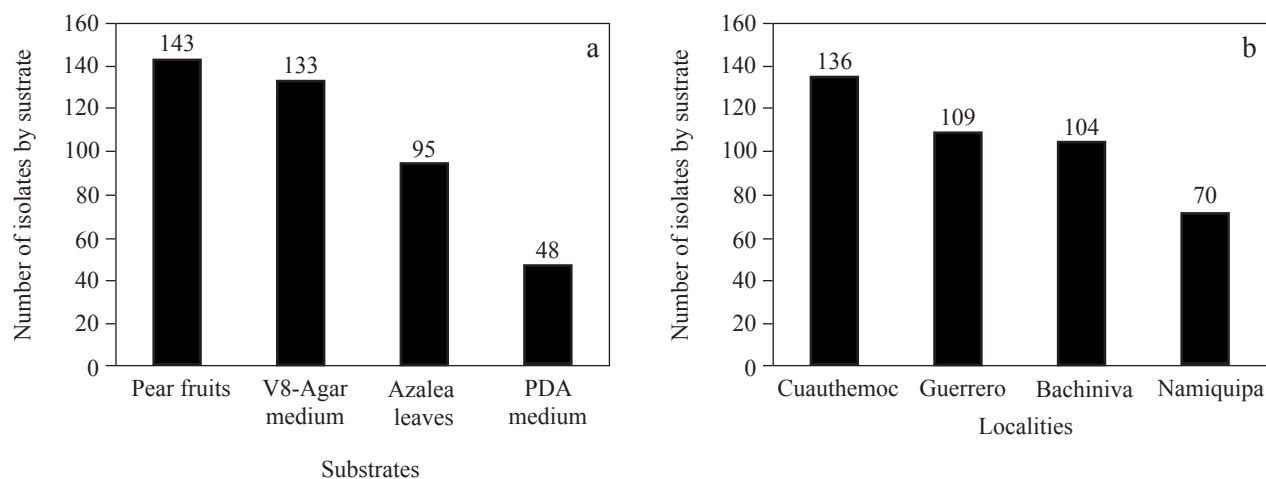


Figura 1. Aislados de *Mortierella* asociados con la rizosfera de manzanos enfermos en cuatro de las principales localidades productoras de manzana en el estado de Chihuahua, México; a) número de aislados obtenidos por sustrato; b) número de aislados obtenidos por localidad.

Figure 1. *Mortierella* isolates associated to diseased apple trees rhizosphere in four main producing localities of Chihuahua State, Mexico; a) number of isolates obtained by substrate; b) number of isolates obtained by locality.

trampa nos permitió obtener el mayor número de aislados (143 aislados, 34.1%), seguido del medio de V8-agar-antibióticos (133 aislados, 31.7%) y del método en que se utilizaron hojas de azalea como sustrato trampa (95 aislados, 22.7%). El método menos eficaz de aislamiento fue el medio de PDA-antibióticos (48 aislados, 11.5%) (Figura 1a). El alto número de microorganismos aislados utilizando frutos de pera pudo haber sido consecuencia de una mayor área de contacto de los frutos con el suelo y de una exposición más prolongada. Las hojas de azalea y frutos maduros de pera se han utilizado como sustratos trampa para aislar otros organismos con resultados favorables. A diferencia de nuestros resultados, Yadav *et al.* (2014) aislaron *Mortierella alpina* en el medio PDA de manera eficiente.

El número de aislados de *Mortierella* que se obtuvo en cada región se muestra en la Figura 1b. El mayor número de aislados (136, 32%) se obtuvo en la región de Cuauhtémoc. Webster y Weber (2007) demostraron que la frecuencia de aislamiento de

fungus is highly variable, depending on the isolation method, culture medium, temperature and other factors during processing of samples. The evident variation in abundance of *Mortierella* in tested orchards might be due to multiple factors such as the geographical location, soil type, rootstock type, age of trees, climatic conditions, technification level, organic matter content, existent vegetation, among other factors. Bosso *et al.* (2017) found *Mortierella* species in soils with different uses and they attributed the high presence of *Mortierella* to the possible control of phytopathogens, since this genus may have disease suppressive properties (Dedyukhina *et al.*, 2014; Zlotek and Wojcik, 2014).

Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were differentiated and identified according to their macro- and microscopic distinctive characters, such as the flower-shaped radial growth of young colonies of white color (Figure 2). However, some of these colonies turned yellow

cada hongo varía mucho, dependiendo del método de aislamiento, el medio de cultivo, la temperatura y otros factores durante el procesamiento de las muestras. La evidente variación en la abundancia de *Mortierella* en los huertos evaluados podría ser resultado de múltiples factores, como la ubicación geográfica, el tipo de suelo, el tipo de porta injertos, la edad de los árboles, las condiciones climáticas, el nivel de tecnificación, el contenido de materia orgánica, la vegetación existente, entre otros. Boso *et al.* (2017) encontraron especies de *Mortierella* en suelo con diferentes usos y atribuyeron la alta presencia de *Mortierella* al posible control de fitopatógenos, ya que este género podría tener propiedades supresoras de enfermedades (Dedyukhina *et al.*, 2014; Zlotek y Wojcik, 2014).

Se diferenciaron e identificaron 419 aislados de Mortierellales, de acuerdo con sus caracteres macro- y microscópicos distintivos, como el crecimiento radial en forma de flor de las colonias jóvenes de color blanco (Figura 2). Sin embargo, al crecer, algunas de las colonias cambiaron de color blanco a amarillo. El micelio de los aislados era hialino y cenocítico, pero en algunas, se observó la presencia de hifas septadas conforme maduraban (Watanabe, 2010). Se observaron también estructuras microscópicas típicas de la reproducción asexual de este género, lo mismo que estructuras de resistencia en forma de clamidosporas catenuladas e intercalares en la mayoría de los aislados (Figura 2, Cuadro 2; Watanabe, 2010). No se observaron estructuras de reproducción sexual como cigosporas. Park *et al.* (2001) demostraron que este tipo de estructura es poco común y suele estar rodeada de micelio cenocítico, y que los cambios morfológicos de *Mortierella* dependen de las condiciones de cultivo y del genotipo del aislado.

Los fragmentos de ADN_g obtenidos después de la amplificación de las muestras del hongo, con los iniciadores ITS4 e ITS5, mostraron mayor

when they grew up. The mycelium of the isolates was hyaline and coenocytic but some hyphae became septated as they aged (Watanabe, 2010). In addition, the microscopic structures typical of asexual reproduction of this genus were observed, besides, the resistance structures as catenulate and intercalary chlamydospores, were also observed in most of the isolates (Figure 2, Table 2; Watanabe, 2010). Sexual reproductive structures such as zygospores, were absent in the isolates. Park *et al.* (2001) demonstrated that this structure type is uncommon and often surrounded by coenocytic mycelia and that the morphological changes of *Mortierella*, were dependent on culture conditions and strain genotype.

gDNA fragments obtained after amplification of the fungal samples, with ITS4 and ITS5 primers, showed high homogeneity. According to the morphological characters and sequences obtained from the PCR products, 12 of the 21 Mortierellales isolates belonged to *Mortierella alpina*, six to *Mortierella* sp., one to *Mortierella gamsii*, one to *Mortierella capitata* and one to the Mortierellales order (Figure 3). All isolates had 99-100% identity and a maximum similarity with the molecular scores and taxonomic keys, corresponding to each strain and according to the sequences available in the GenBank database (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). Melo *et al.* (2014) found *M. alpina* from tissues of the antarctic moss *Schistidium antarctici*, demonstrating that *Mortierella* can be found in high frequency. These differences could be due to the sampling source, since in our study, soil samples were taken from agroecosystems disturbed by anthropogenic activities, mainly by intensive use of pesticides for agricultural pests and diseases management. Nicola *et al.* (2017) found that *Mortierella* is a fungus that is usually found colonizing plant roots and is normally associated with apple replant diseases. In our study, this

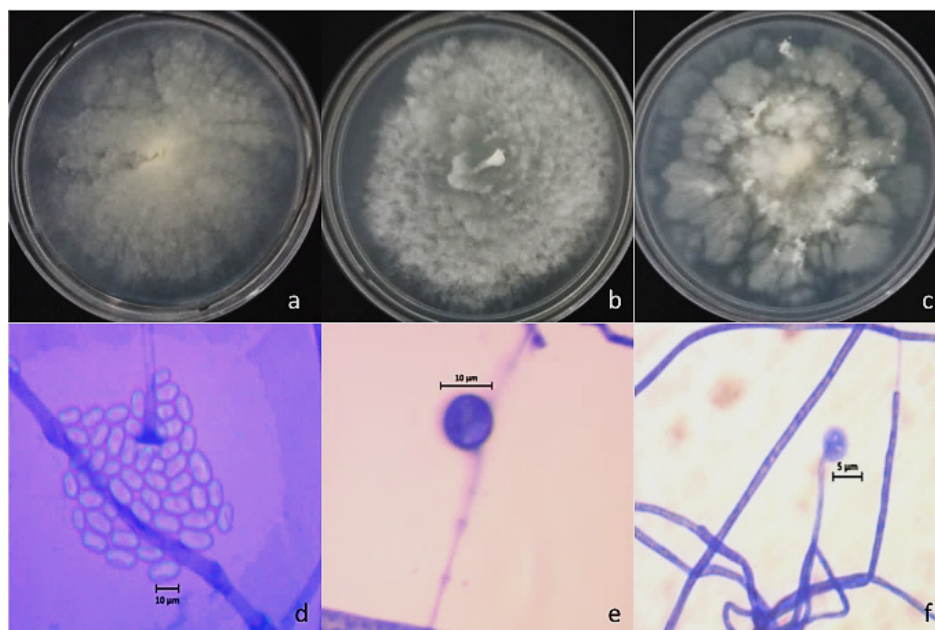


Figure 2. Morfología de *Mortierella* spp., a-c) características macroscópicas de *M. alpina*, *M. alpina* y *Mortierella* sp. sembradas en un medio de cultivo PDA; d-f) caracteres microscópicos, d) esporangiosporas hialinas y ovaladas, e) clamidospora intercalary, f) esporangios terminales.

Figure 2. Morphology of *Mortierella* spp., a-c) macroscopic characteristics grown of *M. alpina*, *M. alpina* and *Mortierella* sp. on PDA culture medium; d-f) microscopic characters, d) sporangiospores hyaline and ovoid, e) intercalary chlamydospore, f) terminal sporangia.

homogeneidad. De acuerdo con los caracteres morfológicos y las secuencias obtenidas de los productos de PCR, se determinó que 12 de los 21 aislados de Mortierellales pertenecían a *Mortierella alpina*, seis a *Mortierella* sp., uno a *Mortierella gamsii*, uno a *Mortierella capitata* y uno al orden de los Mortierellales (Figura 3). Todos los aislados mostraron de 99 a 100% de identidad y máxima verosimilitud con las puntuaciones moleculares y las claves taxonómicas, que corresponden a cada aislado y según las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). Melo *et al.* (2014) encontraron *M. alpina* en tejidos de musgo antártico *Schistidium antarctici*, y demostraron que la presencia de *Mortierella* es muy frecuente. Estas diferencias podrían derivarse de la fuente de las muestras, ya que, en nuestro

replanting process was detected in some sampled orchards.

The maximum likelihood tree showed genetic differences between *Mortierella* isolates. According to O'Donnell *et al.* (2001), some genera and even some species of the Mucorales order are polyphyletic, as can be observed in the phylogenetic tree obtained from the different isolates. Mortierellales isolates were not pathogenic to apple rootstocks G30. Bosso *et al.* (2017) demonstrated that these fungi species can be considered antagonistic due to the ability to produce different substances which can help in the defense of plants, as systemic resistance inducer.

There are several *Mortierella* species associated to the rhizosphere of apple trees with apparent symptoms of root diseases in Chihuahua. The most

Cuadro 2. Principales caracteres microscópicos de aislados de *Mortierella* asociados con la rizosfera de manzanos enfermos en el estado de Chihuahua, México.**Table 2. Main microscopic characters of *Mortierella* isolates associated to diseased apple trees rhizosphere in Chihuahua State, Mexico.**

Código del aislado	Identificación molecular	Forma de los esporangios	Tamaño (µm)	Esporangióforo (µm)	Clamidospora (µm)	Esporangiosporas (forma)
G11	<i>Mortierella</i> sp. (TR065)	Ovalado	5	43	Ausente	
G3-2	<i>M. alpina</i> (FCF20120803)	Esférico	5	50	Intercalar (5-10)	
G17	<i>M. alpina</i> (ATT234)	Esférico	5-7	35-50	Intercalar (5)	
G18	<i>M. alpina</i> (C051D16)	Ovalado	10	50	Intercalar (5-7)	
G21	<i>Mortierella</i> sp. (FMR13-4)	Ovalado	8-12	20	Intercalar (5)	
G26	<i>Mortierella</i> sp. (MEL2385001)	Esférico	5-10	40-55	Catenulada (7-10)	
G29-1	<i>M. alpina</i> C08ID17	Esférico	10-15	30-50	Intercalar (7-10)	
G61	<i>M. alpina</i> MUT: 5194	Ovalado	5-7	20-30	Intercalar (5)	
G31	<i>M. alpina</i> strain xds08088	Esférico	5-10	50-60	Ausente	
G12	<i>M. alpina</i> voucher RIFA 12B	Esférico	10-7	40-70	Intercalar (8-10)	
G54	<i>M. alpina</i> A03ID2	Esférico	10-7	30-50	Intercalar (5-7)	Ovalada
G52	<i>M. alpina</i> ATCC16266	Esférico	7-10	30-50	Intercalar (5-7)	
G14	<i>M. alpina</i> A01ID1	Ovalado	5-10	40-50	Ausente	Ovalada
G44	<i>Mortierella</i> sp. FMR23-12	Esférico	10-15	30-40	Intercalar (5-10)	
G16	<i>M. gamsii</i> aurium 1205	Esférico	5-10	20-40	Intercalar (7-10)	
G2	Uncultured <i>Mortierellales</i>	Esférico	5-10	30-50	Intercalar (5-10)	Ovalada
G9	<i>Mortierella</i> sp. 11MA04	Esférico	5-10	20-40	Intercalar (7-10)	
G25	<i>M. capitata</i>	Ovalado	10	30-40	Catenulada (5-7)	
G32	<i>Mortierella</i> sp. (FMR23-12)	Esférico	5	40-50	Intercalar (5-10)	
G35	<i>Mortierella</i> sp. F0210-20S2	Esférico	7-10	40-50	Intercalar (10-15)	
G43	<i>Mortierella</i> sp. SD006	Ovalado	8-10	30-40	Ausente	

estudio, las muestras de suelo fueron recolectadas en agroecosistemas disturbados por actividades antropogénicas, principalmente por el uso intensivo de plaguicidas para el control de plagas agrícolas y el manejo de enfermedades. Nicola *et al.* (2017) descubrieron que *Mortierella* es un hongo que por lo general coloniza las raíces de las plantas y que normalmente se le asocia con enfermedades de replanteo de manzana. En nuestro estudio detectamos este proceso de replanteo en algunos huertos donde recolectamos las muestras.

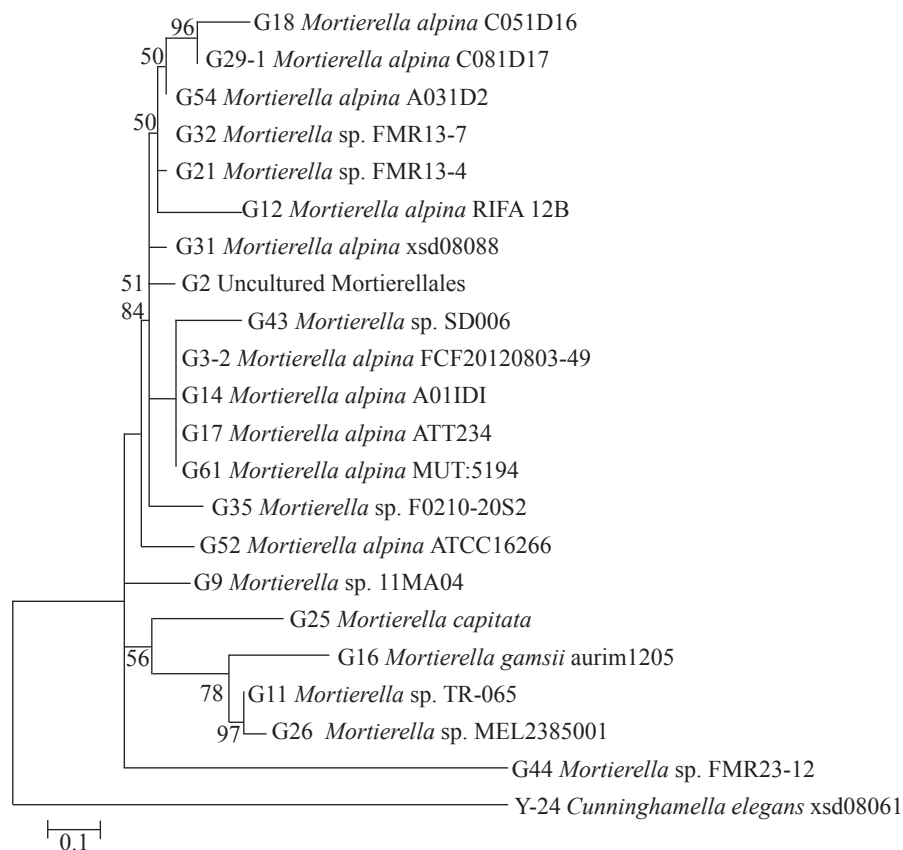
El árbol de máxima verosimilitud mostró diferencias genéticas entre los aislados de *Mortierella*. Según O'Donnell *et al.* (2001), algunos géneros, e incluso algunas especies, del orden Mucorales son polifiléticos, tal como se puede observar en el árbol filogenético de los diferentes aislados. Los

efficient method for the isolation of *Mortierella* involved the use of pear fruits as bait substrate.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

aislados de *Mortierellales* no fueron patogénicos en los porta injertos de manzana G30. Bosso *et al.* (2017) demostraron que estas especies de hongos pueden ser consideradas antagonistas debido a su capacidad de producir diferentes sustancias que pueden ayudar en la defensa de las plantas como inductores de resistencia sistémica.

En Chihuahua existen varias especies de *Mortierella* asociadas con la rizosfera de los manzanos que muestran síntomas aparentes de enfermedades radiculares. El método más eficaz para



**Figura 3.** Árbol de máxima verosimilitud de aislados de *Mortierella* obtenidos en la rizosfera de árboles de manzana enfermos en Chihuahua, México, con base en los resultados de BLAST utilizando las secuencias de la región ITS4 e ITS5 de cada aislado. La barra de escala representa las sustituciones de un nucleótido y los puntos de la rama numérica indican valores de soporte como porcentaje con base en 1,000 repeticiones de bootstrap (se muestran únicamente los valores > 50%).

**Figure 3.** Maximum likelihood tree of *Mortierella* isolates, obtained in diseased apple trees rhizosphere in Chihuahua, Mexico, based on BLAST results from sequences of the ITS4 and ITS5 region of each isolate, the scale bar represents one nucleotide substitutions and numbers branch points indicate values support as percentage based on 1,000 bootstrap replicates (only values > 50% are shown).

el aislamiento de *Mortierella* incluyó el uso de frutos de pera como sustrato trampa.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410. [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bosso L, Lacatena F, Varlese R, Nocerino S, Cristinzio G and Russo D. 2017. Plant pathogens but not antagonists change

- in soil fungal communities across a land abandonment gradient in a Mediterranean landscape. *Acta Oecologica*, 78:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2016.11.002>
- Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Mironov AA, Kamzolova SV, Morgunov IG and Vainshtein MB. 2014. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116:429-437. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300358>
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105:1422-1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Ho SY, Jiang Y and Chen F. 2007. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isola-

- ted from Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:3960-3966. <https://doi.org/10.1021/jf0700071>
- Melo IS, Santos SN, Rosa LH, Parma MM, Silva LJ, Queiroz SCN and Pellizari VH. 2014. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the antarctic moss *Schistidium antarctici*. Extremophiles, 18:15-23. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0588-7>
- Nicola L, Turco E, Albanese D, Donati C, Thalheimer M, Pindo M, Cavalieri ID and Pertot I. 2017. Fumigation with dazomet modifies soil microbiota in apple orchards affected by replant disease. Applied Soil Ecology, 113:71-79. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.002>
- O'Donnell KL, Lutzoni FM, Ward TJ and Benny GL. 2001. Evolutionary relationships among Mucoralean fungi (Zygomycota): Evidence for family polyphyly on a large scale. Mycologia, 93:286-296. <https://doi.org/10.2307/3761650>
- Park EY, Koike Y, Cai HJ, Higashiyama K and Fujikaya S. 2001. Morphological diversity of *Mortierella alpina*: Effect of consumed carbon to nitrogen ratio in flask culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 6:161-166. <https://doi.org/10.1007/BF02932544>
- Raeder U and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, 1:17-20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rayaroth A, Tomar RS and Mishra RK. 2017. Arachidonic acid synthesis in *Mortierella alpina*: Origin, evolution and advancements. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences, 87:1053-1066. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0714-2>
- Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes D.I, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE, and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología, 35:437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Tamura K, Glen S, Peterson D, Filipiski A and Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species (3rd ed.):153-155. CRC Press.
- Webster J and Weber R. 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press White TJ, Bruns, T, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ, Eds. PCR protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York, 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yadav DR, Kim SW, Babu AG, Adhikari M, Kim C, Lee HB and Lee YS. 2014. First report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) isolated from crop field soil in Korea. Mycobiology, 42:401-404. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.401>
- Zlotek U and Wójcik W. 2014. Effect of arachidonic acid elicitation on lettuce resistance towards *Botrytis cinerea*. Scientia Horticulturae, 179:16-20. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.026>