

MICOFLORA ASOCIADA A MANCHAS Y TIZONES FOLIARES EN TRIGO (*Triticum aestivum* L.) DE RIEGO EN EL BAJÍO, MÉXICO

MYCOFLORA ASSOCIATED TO LEAF SPOTS AND BLIGHTS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) UNDER IRRIGATION CONDITIONS IN EL BAJÍO, MEXICO

Luis A. Mariscal-Amaro^{1*}, Ernesto Solís-Moya¹, Santos G. Leyva-Mir², José L. Anaya-López¹, Héctor E. Villaseñor-Mir³

¹Programas de Sanidad Forestal y Agrícola, Trigo y Biotecnología, Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEBAJ), Km. 6.5, Carretera Celaya-San Miguel de Allende, 38110. Celaya, Guanajuato. ²Departamento de Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ³Programa de Trigo y Avena, INIFAP, Campo Experimental Valle de México, Km. 13.5, Carretera Los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, 56250. (mariscal.luis@inifap.gob.mx)

RESUMEN

La producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo riego en la región de El Bajío, México, es afectada principalmente la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks.) y la roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). En años recientes, en esta región se observaron otros síntomas como tizones y manchas foliares que también limitan la productividad de las variedades de trigo sembradas. Para identificar a los hongos asociados con esta sintomatología, en este estudio se recolectaron hojas con síntomas de tizones y manchas foliares en 12 municipios de los estados de Guanajuato, Michoacán y Jalisco, en los ciclos agrícolas otoño-invierno 2012-2013 y 2013-2014. La identificación de los hongos se realizó con la morfología, la amplificación y la secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS). Los hongos fitopatógenos identificados fueron *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Sinónimo: *Helminthosporium sativum* Pammel, C. M. King y Bakke), *Alternaria alternata* (Fr.:Fr), *Septoria tritici*, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. moniliforme* (J. Sheld) (Syn. *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., los saprófitos *Nigrospora* spp., *Torula* spp., *Epicoccum* spp., y el hongo antagonista *Chaetomium globosum* Kunze ex. Fr. Aunque la frecuencia de los hongos fitopatógenos fue baja en ambos ciclos agrícolas, su presencia en esta región es un riesgo potencial porque estos hongos afectan el follaje y al contaminar el grano del trigo pueden causar pudriciones cuando está en el almacén y pudriciones de la raíz y tallo cuando las semilla se usa para la siembra.

ABSTRACT

The production of wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigation in the Bajío region, Mexico, is mainly affected by leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) and stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). In recent years, other symptoms were observed in this region, such as leaf spots and blights, which also limit the productivity of the wheat varieties. In order to identify the fungi associated with these symptoms, leaves with blights and leaf spots were collected from 13 municipalities in the States of Guanajuato, Michoacan and Jalisco, Mexico, during the fall-winter agricultural cycles of 2012-2013 and 2013-2014. The fungi identification was carried out using morphological methods, amplification and sequencing of internal transcribed spacer regions (ITS). The identified pathogenic fungi were: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Synonym: *Helminthosporium sativum* Pammel, CM King and Bakke), *Alternaria alternata* (Fr.:Fr), *Septoria tritici*, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. moniliforme* (J. Sheld) (Syn. *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., the saprophytes *Nigrospora* spp., *Torula* spp., *Epicoccum* spp., and the antagonist fungus *Chaetomium globosum* Kunze ex. Fr. Although the phytopathogenic fungi frequency was low in both crop cycles, its existence in this region is a potential risk, as these fungi affect the foliage, and, if the grain is contaminated, it can rot when stored, or cause the root and stem rot when the seed is used for planting.

Key words: *Bipolaris sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*, *Alternaria alternata*, *Septoria tritici*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2015. Aprobado: noviembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 51: 189-200. 2017.

Palabras clave: *Bipolaris sorokiniana*, *Helminthosporium sativum*, *Alternaria alternata*, *Septoria tritici*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) en México se siembra en 683 mil ha y la producción anual es 3.36 millones de t. En la superficie sembrada de cereales ocupa el tercer lugar después del maíz y el sorgo. La producción de 3.17 millones t se obtiene en condiciones de riego y se concentra en los estados de Sonora, Chihuahua y Jalisco. En El Bajío, que incluye a los estados de Guanajuato, Michoacán, Querétaro y Jalisco, se producen 215 000 t (CANIMOLT, 2015; SIAP, 2015). Las enfermedades foliares se consideran las limitantes principales del rendimiento en el cultivo. La roya de la hoja y la roya lineal amarilla, causadas por *Puccinia triticina* y *P. striiformis* f. sp. *tritici*, son las dos enfermedades más importantes y más estudiadas en trigo con riego en El Bajío (Huerta *et al.*, 2012; Solís *et al.*, 2013; Mariscal, 2014). En esta región se observan manchas y tizones foliares causadas por agentes causales desconocidos y contribuyen al reducir el rendimiento de las variedades sembradas. Zillinsky (1984) y Warham *et al.* (1999) indicaron que los géneros *Helminthosporium* y *Septoria* causan estos síntomas en trigo y son los más importantes. Las especies *H. sativum*, *H. tritici-repentis*, *H. giganteum* y *H. spiciferum* causan los tizones foliares en trigo en el mundo. El hongo *S. tritici* se identificó como la especie principal causante de las manchas foliares. En México, hay varias especies de *Helminthosporium* (Osorio *et al.*, 1998) y *S. tritici* esta en regiones de secano húmedo (Rodríguez *et al.*, 2008). Estos hongos causan pérdidas de rendimiento, de 4 a 38 % (Acharya *et al.*, 2011) y pueden transmitirse por la semilla, lo que causa manchado de grano, pudriciones de raíz y muerte de las plántulas (Zillinsky, 1984).

La hipótesis de nuestro estudio fue que los hongos que causan manchas y tizones foliares en trigo pueden estar en cualquier región donde se siembre el cereal y pueden ocasionar pérdida significativas del rendimiento. El objetivo fue identificar los hongos asociados con manchas y tizones foliares en trigo con riego en El Bajío y conocer su distribución y su frecuencia en esta región.

INTRODUCTION

In Mexico, wheat (*Triticum aestivum* L.) is sown on about 683 000 ha, producing 3.36 million t each year. The area sown with cereals ranks third after maize and sorghum. 3.17 million t are produced under irrigation, mainly in the States of Sonora, Chihuahua and Jalisco. The Bajío region, which includes the states of Guanajuato, Michoacan, Queretaro and Jalisco, is a geographic area the harvest 215 000 t under the same irrigation scheme (CANIMOLT, 2015; SIAP, 2015). Foliar diseases are considered the main limitation of crop yield. The leaf and stripe rust, caused by *Puccinia triticina* and *P. striiformis* f. sp. *tritici*, are the two major diseases, as well as the most studied, in irrigated wheat in the Bajío (Huerta *et al.*, 2012; Solís *et al.*, 2013; Mariscal, 2014). In this region, spots and leaf blights caused by unknown causative agents were observed, contributing to the reduced performance of the currently grown varieties. Zillinsky (1984) and Warham *et al.* (1999) indicated that *Helminthosporium* and *Septoria* genera cause these symptoms in wheat and are the most important. The species *H. sativum*, *H. tritici-repentis*, *H. giganteum* and *H. spiciferum* cause leaf blights in wheat worldwide. The fungus *S. tritici* is identified as the predominant species causing leaf spots. In Mexico, the presence of several species of *Helminthosporium* is documented (Osorio *et al.*, 1998), as well as *S. tritici* on rainfed humid regions (Rodríguez *et al.*, 2008). These fungi cause yield losses, between 4 % and 38 % (Acharya *et al.*, 2011) and can be transmitted by the seed, causing stained grain, root rotting and seedling death (Zillinsky, 1984).

Our hypothesis was that the fungi that cause leaf spot and blight in wheat can be in any region where this cereal is sown and can cause significant yield losses. The aim was to identify the fungi associated with leaf spot and blight in the irrigated wheat area of the Bajío, in order to know its distribution and frequency in this area.

MATERIALS AND METHODS

Collection of leaf tissue

The study included 10 wheat varieties sown in 16 locations in 11 municipalities in the States of Guanajuato, Jalisco and Michoacan, Mexico (Table 1). The varieties were sown in each

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de tejido foliar

En el estudio se incluyeron 10 variedades de trigo sembradas en 16 localidades de 12 municipios de los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán (Cuadro 1). Las variedades se sembraron sembradas en cada localidad dentro de los experimentos de rendimiento del Programa de Trigo de Riego del INIFAP. Las variedades Cortázar S94 y Bárcenas S2002 ocupan la superficie mayor sembrada en El Bajío (Solís *et al.*, 2014). Los muestreos se hicieron durante los ciclos agrícolas otoño-invierno de 2012-2013 y 2013-2014, en la etapa de grano lechoso-masoso próximo a la maduración. Con el esquema de cinco de oros, en cada punto se seleccionó una parcela y de dos surcos al azar por parcela se eligieron dos plantas con síntomas de tizones o manchas foliares, y de ellas se seleccionó una hoja con los síntomas por planta. Esto se hizo en cada punto (10 hojas en total), en todas las localidades muestreadas (160 hojas en total). Las hojas se almacenaron en bolsas glicine para preservarlas, se prensaron y secaron para evitar que se quebraran (Zillinsky, 1984). La incidencia de las enfermedades fue natural en todas las variedades y localidades muestreadas, por las condiciones óptimas de temperatura (>25 °C) y humedad relativa (> 80 %) y el inóculo, ya que en los sitios evaluados la siembra de cereales es constante, lo que es indispensable para el desarrollo de hongos que infectan el follaje del trigo (Narro, 2000; Mariscal 2014).

locality during the Irrigation Wheat Program yield trials, from the INIFAP. The Cortazar S94 and Barcenás S2002 varieties are occupy the largest sown area at El Bajío (Solís *et al.*, 2014). The samplings were made during the fall-winter agricultural cycles 2012-2013 and 2013-2014, at the milky-dough grain stage, close to maturity. The five of gold scheme was used, and on each point, a plot was selected, and of two furrows at random per plot, two plants with blights symptoms or leaf spots were selected. From them, a leaf with the symptoms was picked. This was carried out at each point (10 leaves total) in all sampled locations (160 leaves in total). The leaves were stored in glycine bags for their preservation, pressed and dried to prevent them from breaking (Zillinsky, 1984). The disease incidence was natural in all varieties and sampled locations, given the optimal temperature (25 °C) and relative humidity (80 %), along with the inoculum. That is because, all the evaluated sites are constantly sown with cereals, which is necessary for the development of fungi that infects wheat foliage (Narro, 2000; Marshall 2014).

Isolation and morphological identification of fungi

The samples were processed, and their morphological identification was performed at the Phytopathology Laboratory of INIFAP-CEBAJ; molecular techniques were performed at the Biotechnology Laboratory of the same institution. The collected leaves were processed following the Zillinsky protocol (1984). From each leaf, a central 8 cm length portion was cut and

Cuadro 1. Municipios, número de localidades y variedades de trigo muestreadas en campos de trigo de El Bajío en los ciclos agrícolas otoño-invierno 2012-2013 y 2013-2014.

Table 1. Municipalities, number of locations and sampled wheat varieties in wheat fields in the Bajío during the agricultural cycles fall-winter 2012-2013 and 2013-2014.

Municipio (Estado)	No. de localidades muestreadas	Variedades
Celaya (Guanajuato)	1	Trigal F2014, Luminaria F2012
Guanajuato (Guanajuato)	1	Monarca F2007, Cortázar S94
Irapuato (Guanajuato)	1	Nana F2007
Juventino Rosas (Guanajuato)	1	Gema C2004
Ocampo (Guanajuato)	1	Monarca F2007
Pénjamo (Guanajuato)	5	Urbina S2007, Maya S2007, Bárcenas S2002, Trigal F2014
Salamanca (Guanajuato)	1	Nana F2007, Norteña F2007
Salvatierra (Guanajuato)	1	Nana F2007
Villagrán (Guanajuato)	1	Nana F2007
Yuriria (Guanajuato)	1	Luminaria F2012
Jesús María (Jalisco)	1	Luminaria F2012, Nana F2007
Indaparapeo (Michoacán)	1	Cortázar S94

Aislamiento e identificación morfológica de hongos

Las muestras se procesaron y la identificación morfológica se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del INIFAP-CEBAJ; las técnicas moleculares se efectuaron en el Laboratorio de Biotecnología de la misma institución. Las hojas recolectadas se procesaron con el protocolo de Zillinsky (1984). De cada hoja bandera se cortó una porción central de 8 cm de longitud, se desinfectó por 90 s con hipoclorito de sodio al 5 %. Las porciones se lavaron con agua destilada estéril tres veces y se secaron en papel absorbente estéril. Dos porciones de hoja se pusieron por cámara húmeda. Estas fueron cajas Petri ($\varnothing=10$ cm) con papel filtro absorbente estéril humedecido con agua destilada estéril. Las cámaras se sellaron con parafilm, se etiquetaron y mantuvieron a 24 °C, 48 h, se revisaron y luego cada 24 h según la tasa de crecimiento de los hongos. La identificación se hizo mediante las características de las colonias y observación directa de la morfología de los conidios en el microscopio estereoscópico (Motic®, Modelo SMZ168TH, Motic, China). También se observaron en el microscopio compuesto (Motic®, Modelo BA410, Motic, China) preparaciones temporales con lactofenol al 10 %. La identificación morfológica se realizó con los descriptores utilizados por Leslie y Summerell (2006), Zillinsky (1984) y Warham *et al.* (1999). Con el microscopio estereoscópico y una aguja entomológica se tomaron porciones de micelio crecido en las hojas. Para cada crecimiento se sembraron por duplicado cuatro porciones en forma de cruz en cajas Petri ($\varnothing=10$ cm), con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (Bioxon®) y ácido láctico (0.25 mL L^{-1}) (PDA+AL) y se mantuvieron a 24 °C. Después de 48 a 72 h, según la tasa de crecimiento de cada aislado, se hicieron transferencias de micelio por cuadruplicado mediante la técnica de punta de hifa a cajas Petri con PDA+AL y se mantuvieron a 24 °C. Después de que el hongo creció, se seleccionó una caja, de ella se extrajo una porción de 5 mm^2 que se sembró por duplicado en cajas Petri ($\varnothing=6$ cm) con PDA+AL. De estas se obtuvieron los cultivos puros para la identificación molecular.

Identificación molecular de los hongos

La identificación molecular de los cultivos puros se realizó mediante amplificación por PCR de los espaciadores transcritos internos (ITS), secuenciación y comparación con la base de datos del GenBank.

Extracción de ADN

El ADN total de cada cultivo puro seleccionado se extrajo de acuerdo al protocolo descrito por Lievens *et al.* (2003), con algunas modificaciones, en cultivos de 5 a 10 d de crecimiento. El micelio se obtuvo raspando secciones de 2 cm^2 al margen de

desinfectado por 90 s with 5 % sodium hypochlorite. The portions were washed with sterile distilled water three times and allowed to dry on absorbent sterile paper. Two leaf pieces were placed in a wet chamber. These were Petri dishes ($\varnothing=10$ cm) containing sterile absorbent filter paper moistened with sterile distilled water. The chambers were then sealed with parafilm, labeled and incubated at 24 °C for 48 h before checking, afterward revisions were scheduled every 24 h depending on the fungi growth rate. The identification was made by the characteristics of the colonies, and direct observation of their conidia morphology in a stereoscopic microscope (Motic®, Model SMZ168TH, Motic, China). Also, temporary preparations with 10% Lactofenol were observed in a compound microscope (Motic®, Model BA410, Motic, China). The morphological identification was performed following the descriptors used by Leslie and Summerell (2006), Zillinsky (1984) and Warham *et al.* (1999). Portions of mycelium grown on the leaves were taken with a stereoscopic microscope and an entomological needle. For each growth, were cultured by duplicate four portions crosswise in Petri dishes ($\varnothing=10$ cm), in potato-dextrose agar culture medium (Bioxon®) and lactic acid (0.25 mL L^{-1}) (PDA+LA). These were maintained at 24 °C. After 48 to 72 h, depending on the growth rate of each isolated mycelium, transfers were made by quadruplicate using the tip of hyphae technique into Petri dish with PDA+LA and maintained at 24 °C. After the fungus grew, a Petri dish was selected, a 5 mm^2 portion of it was extracted and cultured by duplicate in Petri dishes ($\varnothing=6$ cm) with PDA + LA. From this dishes, pure cultures were obtained for molecular identification.

Molecular identification of fungi

Molecular identification of the pure cultures was performed by PCR amplification of the internal transcribed spacers (ITS) and sequencing and comparison with the GenBank database.

DNA extraction

The total DNA from each selected pure culture was extracted according to the protocol described by Lievens *et al.* (2003), with some modifications. Cultures of 5 to 10 d of age were used. The mycelium was obtained by scraping 2 cm^2 sections from the margin of the colony and pulverized in a mortar with liquid nitrogen. The powdered mycelium was collected in 1.5 mL Eppendorf tubes, 300 μL of lysis buffer were added (2.5 M LiCl, 50 mM Tris, 62.5 mM EDTA and 4.0 % Triton X-100, pH 8.0) and an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25: 24: 1 v/v). Tubes were manually stirred for 30 s, centrifuged at 9300 g for 10 min (Sorvall microcentrifuge Legend™ Micro 21R™, Model LR58495, Thermo Fisher Scientific, Germany); 250 μL of the supernatant were then transferred to new 1.5 mL

la colonia y pulverizadas en mortero y nitrógeno líquido. El micelio pulverizado se recolectó en tubos Eppendorff de 1.5 mL, mM Tris, 62.5 mM EDTA y 4.0 % Tritón X-100, pH 8.0) y un volumen igual de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v). Los tubos se agitaron manualmente por 30 s, se centrifugaron a 9300 g por 10 min (microcentrifuga Sorvall™ Legend™ Micro 21R, Modelo LR58495, Thermo Fisher Scientific, Alemania); 250 μ L del sobrenadante se transfirieron a tubos Eppendorff nuevos, de 1.5 mL, se agregaron 15 μ L de RNasa por tubo (RNasa A, Qiagen®, Qiagen, 10 mg mL⁻¹) y se mantuvieron a 37 °C durante 30 min, para eliminar el ARN. A los tubos se agregaron 300 μ L de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se agitaron manualmente por 30 s, se centrifugaron a 9300 g por 10 min, y se transfirieron 200 μ L del sobrenadante a tubos Eppendorff nuevos, de 1.5 mL. El ADN total se precipitó adicionando dos volúmenes de etanol absoluto e incubando 15 min a -20 °C. Para compactar el ADN se centrifugaron los tubos a 9300 g por 10 min, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 200 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 11 200 g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA al aire libre por 3 h. La pastilla se resuspendió en 30 μ L de agua desionizada estéril. El ADN genómico se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop 8000, Thermo Scientific®, Modelo ND-8000, Thermo Fisher Scientific, Alemania) a 260 y 280 nm, y su integridad se verificó por electroforesis en geles de agarosa 1 %. Después, todas las muestras de ADN se diluyeron a 10 ng μ L⁻¹ para la amplificación por PCR de los ITS.

Amplificación de ITS por PCR

El iniciador directo ITS1-F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (Gardes y Bruns, 1993) y el reverso ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATGTATGATGC-3' (White *et al.*, 1990) se usaron para amplificar los ITS. Los iniciadores delimitan el ITS1, la región 5.8 S y el ITS2 de los hongos. La reacción en cadena de la polimerasa consistió de 25 ng de ADN molde, 1x PCR amortiguador (SENNA®), 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 μ M del iniciador directo, 1.0 μ M del iniciador reverso y 1 U Taq DNA Polimerasa High Fidelity (SENNA®) en 25 μ L. Las amplificaciones se realizaron en termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®, Modelo T100, EE.UU.) y desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, luego 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 59 °C por 45 s y 72 °C por 90 s, y extensión final de 72 °C por 10 min. Los amplicones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1 % y fotodocumentaron con Gel Logic 212 Pro (Carestream®, Modelo GL 212 Pro, Imaging System, EE.UU.).

Eppendorf tubes, 15 μ L of RNase were added (RNase A, Qiagen, Qiagen, 10 mg mL⁻¹) and maintained at 37 °C for 30 min, to remove RNA. 300 μ L of the phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture (25: 24: 1 v/v) were added to the tubes and manually stirred for 30 s, centrifuged at 9300 g for 10 min, and 200 μ L of the supernatant were transferred to new 1.5 mL Eppendorf tubes. The total DNA was precipitated by adding two volumes of absolute ethanol and then incubating at -20 °C for 15 min. In order to compact the DNA, the tubes were centrifuged at 9300 g for 10 min, their supernatant was then decanted and the DNA pellet was washed with 200 μ L of 70 % ethanol and centrifuged at 11,200 g for 5 min. The supernatant was decanted and the DNA pellet was allowed to dry for 3 h. The pellet was resuspended in 30 μ L of sterile deionized water. Genomic DNA was quantified in a spectrophotometer (Nanodrop 8000, Thermo Scientific®, Model ND-8000, Thermo Fisher Scientific, Germany) at 260 and 280 nm, and its integrity was checked by electrophoresis in 1 % agarose gels. Then, all DNA samples were diluted to 10 ng μ L⁻¹ for PCR amplification of the ITS.

PCR Amplification of ITS

The forward primer ITS1-F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (Gardes and Bruns, 1993) and reverse ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATGTATGATGC-3' White (*et al.*, 1990) were used to amplify the ITS. ITS1 Primers delimit the region 5.8 S and ITS2 from fungi. The polymerase chain reaction consisted of 25 ng of template DNA, 1x PCR buffer (SENNA®), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of forward primer, 1.0 μ M of the reverse primer and 1 U Taq High Fidelity DNA polymerase (SENNA®) in 25 μ L of total volume. Amplifications were carried out in a thermocycler (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Model T100, USA) and initial denaturalization of 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 45 s, 59 °C for 45 s 72 °C for 90 s, and a final extension of 72 °C for 10 min. The amplicons were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gels and photo-documented with Gel Logic 212 Pro (Carestream®, Model GL 212 Pro Imaging System, USA).

Purification and sequencing

The amplified fragments were cut from the Agarose gel with a scalpel, and purified with a Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin™ Columns (Bio Rad®) kit following manufacturer instructions. The amplicons were sequenced in the Department of Genomic Services LANGE BIO, CINVESTAV-Campus Guanajuato. The sequences were compared using the GenBank database and the Nucleotide BLAST tool (NCBI, 2015).

Purificación y secuenciación

Los fragmentos amplificados se cortaron del gel de agarosa con un bisturí y se purificaron con el kit Freeze 'N Squeeze™ DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los amplicones los secuenciaron en el Departamento de Servicios Genómicos del LANGE BIO, CINVESTAV-Campus Guanajuato. Las secuencias se compararon con la base de datos del GenBank y la herramienta Nucleotide BLAST (NCBI, 2015).

Cálculo de la frecuencia de los hongos

La frecuencia de los hongos por municipio (FM) se calculó agrupando los dos ciclos agrícolas; y la frecuencia general (FG) de cada uno por ciclo agrícola, ajustando las fórmulas propuestas por Ifitikhar *et al.* (2006). Para FM se utilizó la fórmula $FM (\%) = (\text{Núm. veces que se identificó al hongo en el total de hojas recolectadas por municipio en los dos ciclos} / \text{total de crecimientos miceliales examinados en todas las hojas}) (100)$. Para FG se utilizó la fórmula $IG (\%) = (\text{número de veces que se identificó al hongo en las hojas recolectadas por ciclo agrícola} / \text{total de crecimientos miceliales analizados en las hojas}) (100)$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

Los hongos identificados fueron de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Torula*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Septoria*. En *Alternaria* se observaron cadenas cortas de cuatro a siete conidios, con coloración castaño claro, ovoides, de paredes lisas, varias septas transversales (Figura 1A) y de 18 a $36 \mu\text{m} \times 10$ a $15 \mu\text{m}$. Estas características coinciden con las descritas por Zillinsky (1984) y Warham *et al.* (1999) en las especies de este género. Los conidios de *Cladosporium* se desarrollaron en grupos arbustiformes (Figura 1B) de coloración gris, con conidióforos ramificados y conidios ovoides, con color castaño claro y en su mayoría con una o dos septas, de 8 a $20 \mu\text{m} \times 3$ a $11 \mu\text{m}$ (Figura 1C) (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). *Epicoccum* se presentó como masas de conidios con coloración castaño oscuro a negra (Figura 1D), la mayoría esféricos, sin septas visibles, con pared rugosa y con diámetro de 13 a $20 \mu\text{m}$; estas características coincidieron con las descritas por Warham *et al.* (1999). Sobre las lesiones se observaron peritecios

Fungi frequency calculation

The frequency of fungi per municipality (FM) was calculated by grouping the two evaluated agricultural cycles; the overall frequency (OF) of each agricultural cycle was adjusted using the formulas proposed by Ifitikhar *et al.* (2006). For FM, we used the formula $FM (\%) = (\text{Num. Times the fungus was identified in the total leaves collected per municipality in both cycles} / \text{total mycelial growth examined in all leaves}) (100)$. For FG, the formula $IG (\%) = (\text{Num. Times the fungus was identified on the collected leaves by agricultural cycle} / \text{total mycelial growths analyzed in leaves}) (100)$.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological identification

The identified fungi belonged to the *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Epicoccum*, *Torula*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Septoria* genera. In the *Alternaria* genus, short four to seven conidia chains were observed, with light brown coloration, ovoid and smooth-walled, with several transverse septa (Figure 1A) and 18 to $36 \mu\text{m} \times 10$ to $15 \mu\text{m}$ in size. These characteristics are consistent with those described by Zillinsky (1984) and Warham *et al.* (1999) for species of this genus. *Cladosporium* conidia developed in bush-like groups of gray color (Figure 1B), with branched conidiophores and ovoid conidia, lightly brown and mostly with one or two septa, 8 to $20 \mu\text{m} \times 3$ to $11 \mu\text{m}$ (Figure 1C) (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). *Epicoccum* presented as masses of conidia with dark brown to black coloring (Figure 1D), the majority it spherical without visible septa, rough wall and diameter of 13 to $20 \mu\text{m}$; these characteristics coincided with those described by Warham *et al.* (1999). On the lesions, spherical and elongated perithecia of *Chaetomium* were observed (Figure 1E). At the perithecia, unicellular oval ascospores were observed (Figure 1F). In *Torula* conidial chains with spherical unicellular conidia were observed with light brown color, approximate 5.5 to $6 \mu\text{m}$ in diameter (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). The fungus *Nigrospora* presented short hyaline conidiophores with light brown coloration, in right angle, conidia were dark brown to black, the majority spherical (Figure 1G) with a diameter of 13 to $15 \mu\text{m}$ (Warham *et al.*, 1999).

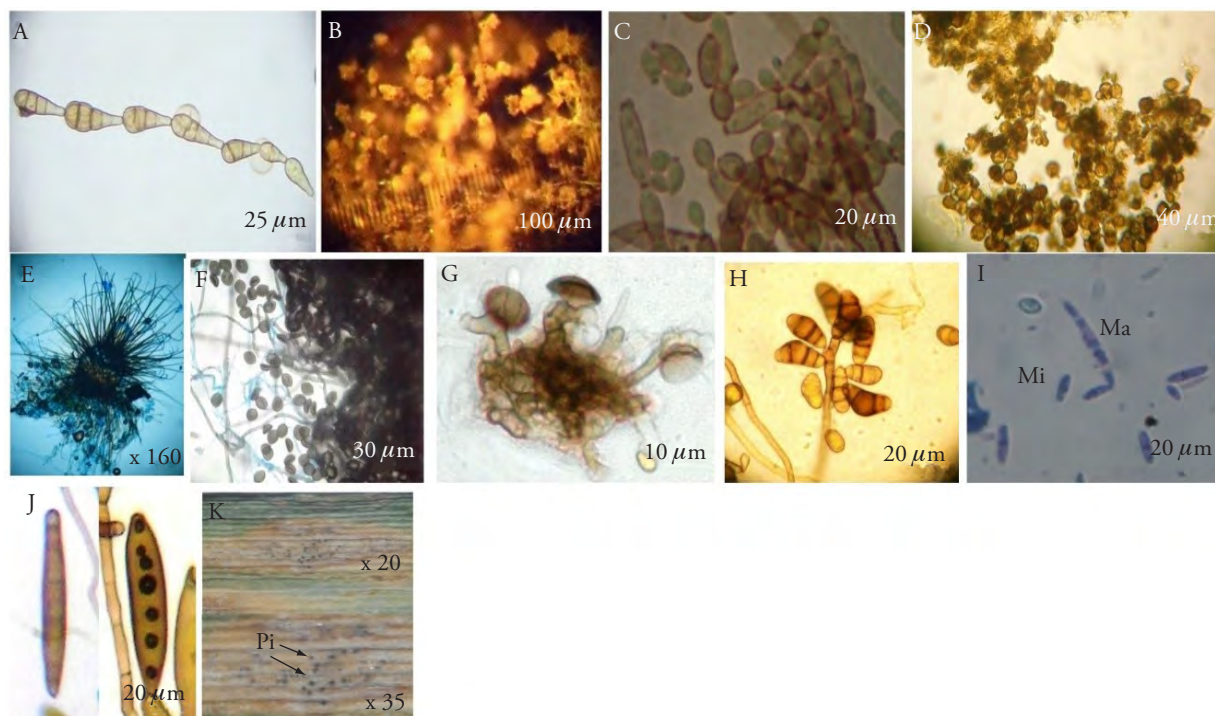


Figura 1. Hongos identificados a partir de tizones y manchas foliares en trigo de riego. Conidios de *Alternaria* spp., (A); conidios en racimo (B) e individuales (C) de *Cladosporium* spp.; conidios de *Epicoccum* spp., (D); peritecio (E) y ascosporas (F) de *Chaetomium* spp.; conidios de *Nigrospora* spp., (G); conidios de *Curvularia* spp., (H); micro (I) (Mi) y macroconidios (I) (Ma) de *Fusarium* spp.; conidios de *Helminthosporium* spp., (J); síntomas y picnidios (Pi) de *Septoria tritici*, crecidos en las hojas (K).

Figure 1. Identified fungi from blights and leaf spots in irrigation wheat. Conidia of *Alternaria* spp., (A); conidia cluster (B) and individual (C) of *Cladosporium* spp.; *Epicoccum* spp., conidia (D); perithecium (E) and ascospores (F) of *Chaetomium* spp.; conidia of *Nigrospora* spp., (G); conidia of *Curvularia* spp., (H); micro (I) (Mi) and macroconidia (I) (Ma) of *Fusarium* spp.; conidia of *Helminthosporium* spp., (J); symptoms and pycnidia (Pi) of *Septoria tritici* grown on leaves (K).

esféricos y alargados de *Chaetomium* (Figura 1E). En los peritecios se observaron ascosporas unicelulares ovaladas (Figura 1F). En *Torula* se observaron cadenas conidiales con conidios esféricos, unicelulares, con coloración castaño claro, diámetros aproximados de 5.5 a 6 μm (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). El hongo *Nigrospora* presentó conidióforos cortos con coloración castaño claro a hialina, en ángulo recto y conidios de color castaño oscuro a negro, la mayoría esféricos (Figura 1G) y con diámetro de 13 a 15 μm (Warham *et al.*, 1999).

El hongo *Curvularia* presentó conidióforos individuales de coloración castaño claro con varias septas, rectos y sin ramificaciones (Figura 1H); los conidios eran curvos con cuatro septas visibles, coloración castaño claro los más jóvenes y castaño oscuro al envejecer. La célula central del conidio fue más grande y oscura que las demás (Figura 1H) (Zillinsky, 1984;

Individual conidiophores were observed in *Curvularia* of light brown coloration with several septa, conidiophores were straight with no ramification (Figure 1H); the conidia were curved with four visible septa, light brown coloration when young and darker brown as they aged. The central cell of the conidia was larger and darker than the others (Figure 1H) (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999) in *Fusarium*, hyaline microconidia were observed, the most straight, with 1 to 2 septa of 9 to 22 μm x 3 to 6 μm (Figure 1I). The macroconidia were slightly curved with 3 to 4 septa and with a curved apical cell of 25 to 42 μm x 3 to 5 μm (Figure 1I) (Leslie and Summerell, 2006). In *Helminthosporium* individual conidia with conidiophores in clusters and dark brown to black coloring were observed. There were two types of conidia (Figure 1J), a straight, single, slightly wider in the middle, with brown-olive

Warham *et al.*, 1999). En *Fusarium* se observaron microconidios hialinos, la mayoría rectos, con 1 a 2 septas de 9 a $22\ \mu\text{m} \times 3$ a $6\ \mu\text{m}$ (Figura 1I). Los macroconidios fueron ligeramente curvos con 3 a 4 septas y con una célula apical curvada de 25 a $42\ \mu\text{m} \times 3$ a $5\ \mu\text{m}$ (Figura 1I) (Leslie y Summerell, 2006). En *Helminthosporium* se observaron conidióforos individuales con conidios en forma de racimo y coloración castaño oscuro a negra. Los conidios (Figura 1J) fueron de dos tipos, unos rectos, individuales, ligeramente más anchos en el medio, con coloración café olivácea a café clara, 6 a 10 septas con puntas redondeadas y 60 a $78\ \mu\text{m} \times 15$ a $20\ \mu\text{m}$. Los otros conidios fueron cortos, ovalados, con los extremos más redondeados y más anchos en el medio, con 6 a 8 septas de 55 a $73\ \mu\text{m} \times 12$ a $17\ \mu\text{m}$ (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). *Septoria tritici* se identificó con base en los signos y síntomas solo en lesiones de las hojas; estas eran manchas irregulares de coloración castaño oscuro con desarrollo de los picnidios típicos (Figura 1K) (Zillinsky, 1984).

Identificación molecular

La identificación molecular se hizo en *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Chaetomium* spp., *Helminthosporium* spp., y *Alternaria* spp., pues en los cultivos puros presentaron diferencias morfológicas, como en la coloración del micelio, tipo de crecimiento de las hifas, pigmentación del medio de cultivo y morfología de los conidios, y podían deberse a la presencia de más especies. Las seis secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del GenBank (NCBI, 2015) con los números de acceso KR819408, KR819405, KR819409, KR819406, KR819404 y KR819407. La comparación en el BLAST de la secuencia KR819408 (383 pb) tuvo similitud de 97 % con la de *F. proliferatum* (GenBank No. de acceso KJ439117), KR819405 (763 pb) tuvo similitud de 100 % con la de *F. equiseti* (GenBank No. de acceso HQ718414), KR819409 (262 pb) fue 100 % similar a la secuencia JF499675 de *Gibberella moniliformis* (Anamorpho: *F. moniliforme*, Sin. *F. verticillioides*), KR819406 (877 pb) fue 97 % similar a *Chaetomium globosum* (GenBank No. de acceso KP067226), KR819404 (970 pb) fue 99 % similar a la secuencia KP174682 de *B. sorokiniana* (Sinónimo: *H. sativum*) y KR819407

colour to light brown, 6 to 10 septa with rounded tips and 60 to $78\ \mu\text{m} \times 15$ to $20\ \mu\text{m}$. The other conidia shorter, oval, with more rounded ends and wider in the middle, with 6 to 8 septa from 55 to $73\ \mu\text{m} \times 12$ to $17\ \mu\text{m}$ (Zillinsky, 1984; Warham *et al.*, 1999). *Septoria tritici* was identified based on the signs and symptoms only of the leaf injuries; these were irregular patches of dark brown coloration with typical pycnidia development (Figure 1K) (Zillinsky, 1984).

Molecular identification

Molecular identification was made in *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Chaetomium* spp., *Helminthosporium* spp., and *Alternaria* spp., given that they presented morphological differences in the pure cultures, as in their mycelium color, type of hyphal growth, pigmentation of the culture medium and conidia morphology. These could be due to the presence of more species. The six obtained sequences were stored in the GenBank database (NCBI, 2015) with access numbers KR819408, KR819405, KR819409, KR819406, KR819404 and KR819407. BLAST comparison at the KR819408 (383 bp) sequence had a 97 % similarity with *F. proliferatum* (GenBank access No. KJ439117). KR819405 (763 bp) had a 100 % similarity with *F. equiseti* (GenBank access No. HQ718414). KR819409 (262 bp) was a 100 % similar to JF499675 *Gibberella moniliformis* sequence (Anamorph: *F. moniliforme*, synonym *F. verticillioides*). KR819406 (877 bp) was 97 % similar to *Chaetomium globosum* (GenBank access No. KP067226). KR819404 (970 bp) was 99 % similar to the sequence KP174682 of *B. sorokiniana* (synonym: *H. sativum*) and KR819407 (973 bp) showed 99 % similarity to *Alternaria alternata* (GenBank access No. KJ867625). A sequence of *Curvularia* spp., of 148 bp, was 100 % similar to sequences of *Cochliobolus lunatus* and *C. geniculatus* (GenBank access No. JX868663 and KF946043), teleomorphs of *C. lunata* and *C. geniculata*; but no access number was assigned given that their sequence was less than the 200 bp indicated by GenBank. The molecular characterization confirmed the morphology identification and allowed the identification of the species by taxonomic keys.

(973 pb) mostró 99 % de similitud con *Alternaria alternata* (GenBank No. de acceso KJ867625). Una secuencia de *Curvularia* spp., de 148 pb, tuvo 100 % de similitud con las secuencias de *Cochliobolus lunatus* y *C. geniculatus* (GenBank No. de acceso KF946043 y JX868663), teleomorfos de *C. lunata* y *C. geniculata*, respectivamente; pero, no se le asignó un número de acceso ya que su secuencia fue menor a las 200 pb que señala el GenBank. La caracterización molecular confirmó la identificación morfológica y permitió identificar la especie de los géneros mediante claves taxonómicas.

Frecuencia de hongos

Chaetomium spp., se aisló con frecuencia mayor en los dos ciclos de cultivo y en la mayoría de los municipios (Cuadro 2) (Figura 2); se considera saprófito (Warham *et al.*, 1999) y causante de decoloración del grano de trigo (APS, 1987). *Chaetomim globosum* no está reportado como causante de manchas o tizones foliares; pero, ha mostrado actividad antagónica contra *B. sorokiniana*, *S. tritici* y *A. triticimacularis* (Perelló *et al.*, 2002; Aggarwal *et al.*, 2004). Por lo tanto, en nuestro estudio su frecuencia alta en el follaje afectado podría deberse a que actuaba como un microorganismo antagónico.

Fungi frequency

Chaetomium spp., was the most frequently isolated in the two crop cycles and in the majority of the assessed municipalities (Table 2) (Figure 2); it is considered a saprophyte (Warham *et al.*, 1999) and the cause of wheat grain discoloration (APS, 1987). *Chaetomim globosum* is not reported to cause leaf spots or blights; but it has shown antagonistic activity against *B. sorokiniana*, *S. tritici* and *A. triticimacularis* (Perello *et al.*, 2002; Aggarwal *et al.*, 2004). Therefore, its high frequency in the affected foliage in our study could be due to the fact of its activity as an antagonistic microorganism.

The genus *Alternaria* was the second most frequent and it appeared in more than 30% of the grown mycelia, in both of the agricultural cycles analyzed (Figure 2). The species *A. alternata*, identified in this study, has caused leaf blights that have generated considerable losses in wheat and rice elsewhere (Iram and Ahmad, 2005; Iftikhar *et al.*, 2006). This fungus can be dangerous for oat crops in the Central Mexican Plateau (García *et al.*, 2013). *Bipolaris sorokiniana* (syn. *H. sativum*) is causing leaf blight in wheat and is considered one of the most destructive fungi for this cereal in some areas of the world (Acharya *et al.*, 2011), which has cost 20 to

Cuadro 2. Hongos identificados en variedades de trigo con síntomas de tizones y manchas foliares; y su frecuencia en porcentaje por municipio. Ciclos agrícolas otoño-invierno 2012-2013 y 2013-2014.

Table 2. Fungi identified in wheat varieties with symptoms of leaf spots and blights; frequency and percentage by municipality. Fall-winter 2012-2013 and 2013-2014 agricultural cycles.

Municipio	NHR/NCME	Hongos identificados (Frecuencia %)
Celaya	10/8	<i>Alternaria</i> (88), <i>Epicoccum</i> (12)
Guanajuato	10/10	<i>Alternaria</i> (30), <i>Chaetomium</i> (70)
Irapuato	10/32	<i>Alternaria</i> (25), <i>Chaetomium</i> (25), <i>Nigrospora</i> (6), <i>Fusarium</i> (13), <i>Helminthosporium</i> (9), <i>Cladosporium</i> (9), <i>Curvularia</i> (13)
Juventino Rosas	10/10	<i>Alternaria</i> (30), <i>Chaetomium</i> (40), <i>Torula</i> (20), <i>Helminthosporium</i> (10)
Ocampo	10/8	<i>Alternaria</i> (37), <i>Chaetomium</i> (63)
Pénjamo	50/89	<i>Alternaria</i> (29), <i>Chaetomium</i> (35), <i>Nigrospora</i> (6), <i>Fusarium</i> (11), <i>Epicoccum</i> (8), <i>Curvularia</i> (5), <i>Helminthosporium</i> (3), <i>Cladosporium</i> (3)
Salamanca	10/10	<i>Alternaria</i> (50), <i>Chaetomium</i> (50)
Salvatierra	10/14	<i>Fusarium</i> (57), <i>Torula</i> (36), <i>Helminthosporium</i> (7)
Villagrán	10/19	<i>Alternaria</i> (42), <i>Chaetomium</i> (53), <i>Helminthosporium</i> (5)
Yuriria	10/10	<i>Alternaria</i> (80), <i>Chaetomium</i> (10), <i>Torula</i> (10)
Jesús María	10/15	<i>Alternaria</i> (34), <i>Chaetomium</i> (33), <i>Septoria</i> (33)
Indaparapeo	10/14	<i>Alternaria</i> (21), <i>Chaetomium</i> (29), <i>Torula</i> (21), <i>Septoria</i> (29)

NHR/NCME: No. de hojas recolectadas/No. crecimientos miceliales examinados. ♦ NHR/NCME: No. of collected leaves/No. examined mycelial growth.

El género *Alternaria* fue el segundo más frecuente y se presentó en más de 30 % de los crecimientos miceliales analizados en ambos ciclos agrícolas (Figura 2). La especie *A. alternata*, identificada en este estudio, ha causado tizones foliares que generan pérdidas altas en trigo y arroz en otras partes del mundo (Iram y Ahmad, 2005; Iftikhar *et al.*, 2006). Este hongo puede ser peligro para avena en la Meseta Central de México (García *et al.*, 2013). *Bipolaris sorokiniana* (sin. *H. sativum*) es causante del tizón foliar en trigo y se considera uno de los hongos más destructivos en este cereal en algunas partes del mundo (Acharya *et al.*, 2011), donde se han estimado pérdidas de 20 a 60 % de rendimiento (Duveiller *et al.*, 2007; Rattu *et al.*, 2011). En cinco municipios de Guanajuato (Cuadro 2) se identificó *B. sorokiniana* (sin. *H. sativum*), su frecuencia fue baja (Figura 2), probablemente porque las condiciones no eran óptimas y por el efecto antagónico de *C. globosum*. *Septoria* spp., se identificó como *Septoria tritici* porque en las plantas de las que se recolectó se identificaron síntomas solo en las hojas, en contraste con *S. nodorum* que infecta también las glumas (Eyal *et al.*, 1987). La especie *S. tritici* es causante de la mancha foliar y causa pérdidas de rendimiento de 44 % en México (Rodríguez *et al.*, 2008) y de 12 % en trigos con riego en otros partes del mundo (Rezgui *et al.*, 2008). Este hongo solo se identificó en los municipios de Michoacán y Jalisco, con una frecuencia baja similar a *B. sorokiniana*. Este es el primer reporte de estos tres hongos en trigo con riego en El Bajío. Varias especies de *Fusarium* que causan lesiones en hojas en ambientes húmedos también están documentadas (APS, 1987); *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *F. moniliforme* infectan hojas de trigo en EUA (Ali y Franci, 2001), y *F. equiseti* en hojas jóvenes de cereales en los Valles Altos de México (Zillinsky, 1984); estos no se consideran importantes causantes de tizones. Pero, las tres especies son patógenas, causan la roña del trigo (Chehri *et al.*, 2011), pueden sintetizar micotoxinas y causar pudriciones de la raíz (Goswami *et al.*, 2008). Por lo tanto, los patógenos en condiciones óptimas podrían ser un peligro para el cultivo.

El hongo *Curvularia* spp. se identificó en dos municipios (Cuadro 2) con frecuencia baja (Figura 2) y está identificado como causante de manchas foliares en trigo (Warham *et al.*, 1999), sorgo y maíz (*C. lunata*); y en maíz causó hasta 60 % de pérdidas (Akinbode, 2010). Aunque con *Cladosporium*

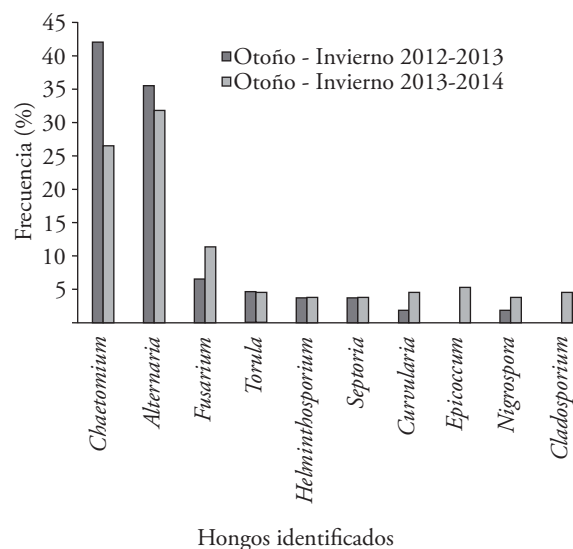


Figura 2. Frecuencia general de hongos identificados en hojas de trigo con síntomas de tizones y manchas foliares recolectadas en El Bajío, en los ciclos agrícolas otoño-invierno 2012-2013 y 2013-2014.

Figure 2. General frequency of fungi identified in wheat leaves with leaf spots and blights symptoms collected at the Bajío, during fall-winter 2012-2013 and 2013-2014 agricultural cycles.

60 % of yield losses (Duveiller *et al.*, 2007; Rattu *et al.*, 2011). In five municipalities in Guanajuato (Table 2) *B. sorokiniana* (syn. *H. sativum*) was identified, but with a low frequency (Figure 2), probably because the conditions were not optimal along with the antagonistic effect of *C. globosum*. *Septoria* spp., was identified as *Septoria tritici* because the collected plants showed symptoms only in the leaves, in contrast to *S. nodorum* that also it infects the glumes (Eyal *et al.*, 1987). *Septoria tritici* is the species responsible of the leaf spot and it causes 44 % yield losses in Mexico (Rodríguez *et al.*, 2008) and 12 % in irrigated wheat in other countries (Rezgui *et al.*, 2008). This fungus was identified only in the Michoacan and Jalisco municipalities. It had low frequency, similar to that of *B. sorokiniana*. This is the first report of these three fungi on irrigated wheat at the Bajío. Several species of *Fusarium* that cause lesions on leaves in humid environments are also documented (APS, 1987); *F. Equiseti*, *F. proliferatum*, and *F. moniliforme* were identified in infected wheat leaves in the United States (Ali and Franci, 2001), and *F. equiseti* in young leaves of cereals in the

spp. se ha observado su asociación más frecuente al moho negro u hollín de la espiga de trigo (Warham *et al.*, 1999; APS, 1987), Smiley *et al.* (1993) aislaron con mayor frecuencia a tres especies de este género a partir de las lesiones foliares al evaluar la enfermedad llamada “mancha fisiológica de la hoja” en este cereal. La frecuencia de los hongos *Torula* spp., *Epicoccum* spp. y *Nigrospora* spp. que se consideran saprófitos (Warham *et al.*, 1999), fue baja. Aunque *Nigrospora* spp. es uno de los hongos causantes del punto negro del grano del trigo (APS, 1987), en arroz se aisló de lesiones foliares (Hajano *et al.*, 2011). *Torula* spp., y *Epicoccum* spp., causan también moho negro y manchado en el grano (Warham *et al.*, 1999; APS, 1987) pero, en nuestro estudio parece que estaban como invasores secundarios en las lesiones foliares causadas por los otros hongos (Zillinsky, 1984).

CONCLUSIONES

En el Bajío, México, se identificaron a los hongos *B. sorokiniana*, *A. alternata* y *Septoria tritici*, en manchas y tizones foliares de trigo. También se identificaron *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., y *Nigrospora* spp. Aunque la frecuencia de la mayoría de los hongos fitopatógenos fue baja, por su incidencia en todas las variedades sembradas y el movimiento de semilla contaminada, podrían incidir en cualquier zona productora del cereal.

LITERATURA CITADA

- Acharya K., A. Dutta K., and P. Pradhan. 2011. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 1064-1071.
- Aggarwal R., K. Tewari A., D. Srivastava K., and V. Singh D. 2004. Role of antibiosis in the biological control of spot blight (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* 157: 369-377.
- Akinbode O., A. 2010. Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 4: 797-800.
- Ali, S., and L. Franci. 2001. Progression of *Fusarium* species on wheat leaves from seedling to adult stages in North Dakota. National Fusarium Head Blight Forum. US Wheat and Barley Scab Initiative. Kentucky, USA. pp: 99.
- American Phytopathological Society (APS). 1987. Compendium of wheat diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 112 p.
- CANIMOLT. 2015. Reporte estadístico 2013. <http://www.canimolt.org>. (Consulta: mayo 2015).
- Mexican high valleys (Zillinsky, 1984); these are not considered an important cause of blights. But the three species are pathogenic, cause wheat scab (Chehri *et al.*, 2011) and can synthesize mycotoxins and cause root rots (Goswami *et al.*, 2008); because of this, the pathogen in optimal conditions could be a danger to the crops.
- The fungus *Curvularia* spp. was identified in two municipalities (Table 2) with low frequency (Figure 2). This was identified as the cause of leaf spots in wheat (Warham *et al.*, 1999), sorghum and maize (*C. lunata*); and in maize it caused up to 60% of losses (Akinbode, 2010). Although it was observed that *Cladosporium* spp. is more frequently associated with black mold or soot of wheat ear (Warham *et al.*, 1999; APS, 1987), Smiley *et al.* (1993) isolated with a high frequency three species of this genus from foliar injuries to assess a disease called “physiological leaf spot” in this cereal. The frequency of the *Torula* spp., *Epicoccum* spp., and *Nigrospora* spp., fungi which are considered saprophytes (Warham *et al.*, 1999), was low. Although *Nigrospora* spp., is one of the causes for the black spot in wheat grain (APS, 1987), in rice it was isolated from leaf lesions (Hajano *et al.*, 2011). *Torula* spp., and *Epicoccum* spp., also cause black mold and spots in wheat (Warham *et al.*, 1999; APS, 1987), but in our study it seems that they were as secondary invaders in leaf lesions caused by other fungi (Zillinsky, 1984).

CONCLUSIONS

In the Bajío, Mexico, the *B. sorokiniana*, *A. alternata* and *Septoria tritici* fungi were identified in spots and leaf blights of wheat. *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., and *Nigrospora* spp., were also identified. Although the frequency of most phytopathogenic fungi was low, its impact on all sown varieties and the movement between regions of contaminated seeds, could affect any production area of this cereal.

—End of the English version—

-----*

- Duveiller, E., P. Singh R., and M. Nicol J. 2007. The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica* 157: 417-430.
- Eyal, Z., L. Sharen A., M. Prescott J., and M. van Ginkel. 1987. The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT. México, D. F. 46 p.
- García, L. E., S. G. Leyva M., H. E. Villaseñor M., M. F. Rodríguez G., y M. Tovar P. 2013. Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo, en avena (*Avena sativa* L.) en la meseta central de México. *Agrociencia* 47:815-827.
- Gardes, M., and D. Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Goswami, S., R., Dong Y., and Z. Punja K. 2008. Host range and micotoxin production by *Fusarium equiseti* isolates originating from ginseng field. *Can. J. Plant Pathol.* 30: 155-160.
- Hajano, J., M. Patham A., Q. Rajput A., and M. Lodhi A. 2011. Rice blast-mycoflora, symptomatology and pathogenicity. *Int. J. Agro Vet. Med. Sci.* 5: 53-63.
- Huerta E., J., R. Torres G., M. F. Rodríguez G., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M., y E. Solís M. 2012. Resistencia a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) en variedades de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). *Rev. Mex. Cienc. Agr.* 3:879-891.
- Ifthikhar, S., Asad S., Munir A., Ifthikhar A., and Sultan A. 2006. Prevalence and distribution of foliar blight pathogens of wheat in different agro ecological zones of Pakistan with special reference to *Bipolaris sorokiniana*. *Pak. J. Bot.* 38: 205-210.
- Iram, S., and Ahmad I. 2005. Prevalence and disease incidence of foliar blight of wheat in rice wheat cropping system of Punjab. *Pak. J. Bot.* 37: 973-980.
- Leslie F., J. and B. Summerell A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First Edition. Blackwell Publishing. Manhatan, USA. 388 p.
- Lievens, B., Brouwer M., R. C. A. Vanachter C., A. Lévesque C., A. B. Cammue P., and H. J. B. Thomma P. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 113-122.
- Mariscal A., L. A. 2014. Enfermedades. In: Tecnología para la producción sustentable de trigo de riego en el Bajío. Solís M., E., y A. Guillén G. (comps.). Libro Técnico No. 6. INIFAP-CEBAJ, Guanajuato, México. pp: 166-186.
- Narro S., J. 2000. Descripción y tratamiento de enfermedades. In: Trigo de riego: origen, variedades, manejo del cultivo, calidad industrial. Solís M., E. y A. Guillén G. (comps.). Libro Técnico No. 2. INIFAP-CEBAJ, Guanajuato, México. pp: 71-84.
- NCBI. 2015. GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov. (Consulta: abril 2015).
- Osorio, A., L., I. García A., F. López F., and Duveiller E. 1998. Improving Control of Tan Spot Caused by *Pyrenophora tritici-repentis* in the Mixteca Alta of Oaxaca, Mexico. In: Duveiller E., J. Dubin H., Reeves J., and McNab A. (eds). 1998. Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. Mexico, D. F., CIMMYT. 180 p.
- Perelló A., R. Simón M. and M. Arambarri A. 2002. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. *J. Phytopathol.* 150: 232-243.
- Rattu R., A., Asad S., Fayyaz M., Zakria M., Ifthikhar S., and Ahmad Y. 2011. Status of foliar diseases of wheat in Punjab, Pakistan. *Mycopath* 9: 39-42.
- Rezgui, S., M. Moez F., Boukef S., Rhaïem A., Chérif M., Chérif M., and A. Hassine Y. 2008. Effect of common cultural practices on Septoria leaf blotch disease and grain yield of irrigated durum wheat. *Tun. J. Plant Prot.* 3: 59-67.
- Rodríguez C., M. E., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M., J. Huerta E., J. S. Sandoval I., y H. M. Santos P. 2008. Efecto de *Septoria tritici* en el rendimiento de trigo de temporal en ambientes lluviosos de los Valles Altos Centrales de México. *Agrociencia* 42: 435-442.
- SIAP. 2015. Cierre de la producción agrícola por estado 2013. www.siap.gob.mx (Consulta: mayo 2015).
- Smiley W., R., M. Gillespie-Sasse L., and Uddin W. 1993. Physiologic leaf spot of winter wheat. *Plant Dis.* 77: 521-527.
- Solís M., E., J. Huerta E., M. F. Rodríguez G., H. E. Villaseñor M., E. Espitia R., L. Ledesma R., y F. M. P. Suaste. 2013. Resistencia a roya de la hoja en variedades de trigo (*Triticum* spp. L.) adaptadas a El Bajío, México. *Agrociencia* 47: 457-469.
- Solís M., E., O. A. Grageda C., A. Ramírez R., M. L. de la Cruz G., L. Ledesma R., y M. P. Suaste F. 2014. Variedades de trigo harinero y cristalino sembradas en El Bajío. In: Tecnología para la producción sustentable de trigo de riego en el Bajío. Solís M., E., y A. Guillén G. (comps.). Libro Técnico No. 6. INIFAP-CEBAJ, Guanajuato, México. pp: 31-54.
- Warham E., J., D. Butler L., y C. Sutton B. 1999. Ensayos para la semilla de maíz y trigo. Manual de laboratorio. CYMMYT, México, D. F. 84 p.
- White T., J., Burns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., A., H. Gelfand D., J. Sninsky J., and J. White T. (eds). PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. San Diego, California. pp: 315-322.
- Zillinsky F., J. 1984. Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño. CIMMYT. México, D. F. 141 p.