

SITUACIÓN ACTUAL DE HONGOS ASOCIADOS A LA SECADERA DE LA FRESA (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) EN GUANAJUATO, MÉXICO

CURRENT STATUS OF FUNGI ASSOCIATED WITH STRAWBERRY (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) DRY WILT IN GUANAJUATO, MÉXICO

Luis A. Mariscal-Amaro^{1*}, Alfredo Rivera-Yerena², Pedro A. Dávalos-González¹, Daniel Ávila-Martínez²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío (INIFAP-CEBAJ), Departamento de Sanidad Forestal y Agrícola. 38110. km. 6.5, Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, México. (mariscal.luis@inifap.gob.mx). ²Instituto Tecnológico de Roque. 38110. km. 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, Celaya, Guanajuato, México.

RESUMEN

La secadera de la fresa (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) es la enfermedad principal de este cultivo en el estado de Guanajuato, México, y causa pérdidas de hasta 7.5 Mg ha⁻¹ (50 % de la producción). En Guanajuato la enfermedad se asocia con 14 especies de hongos y *Fusarium oxysporum* es el más frecuente. El objetivo de este estudio fue conocer la presencia y frecuencia actual de los hongos e identificar otras especies asociadas con esa enfermedad, para lo cual se analizaron plantas con síntomas típicos de la enfermedad provenientes de 34 parcelas comerciales durante los ciclos primavera-verano 2014 y 2015. La identificación de los hongos se hizo mediante características culturales, morfológicas y amplificación y secuenciación de las regiones espaciadoras transcritas (ITS). Los hongos de los géneros *Fusarium*, *Alternaria* y *Rhizoctonia* tuvieron frecuencias de 54, 36 y 11 % de 511 aislados puros obtenidos en el 2014; y 60, 29 y 11 % de 833 aislados puros del 2015. Con la comparación de las ITS se identificó a *F. oxysporum* y *F. verticillioides*; además, a *F. proliferatum* y otras cuatro especies de este género no reportadas en el cultivo. Mediante características culturales y morfológicas se identificó a *A. alternata* aislada de tejido dañado de raíz y corona. Este es un reporte nuevo de otras especies de *Fusarium* y *Alternaria* asociadas con la secadera de la fresa en Guanajuato, México.

Palabras clave: *Fragaria*×*ananassa*, *Fusarium pseudonygamai*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium verticillioides*.

ABSTRACT

Strawberry dry wilt (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) is the main disease in this crop at the state of Guanajuato, Mexico. It causes losses of up to 7.5 Mg ha⁻¹ (50 % of the production). In Guanajuato this disease is associated with 14 fungi species, *Fusarium oxysporum* is the most common. The objective of this study was to assess the presence and current fungi frequency and identify other species associated with the disease. For which, plants with typical symptoms of the disease from 34 commercial plots were analyzed during the spring-summer cycles 2014 and 2015. The fungi identification was made by cultural and morphological characterization and sequencing amplification of transcribed spacer region (ITS) characteristics. Fungi from the *Fusarium*, *Alternaria* and *Rhizoctonia* genera had frequencies of 54, 36 and 11 % from 511 pure isolates obtained in 2014; and 60, 29 and 11 % from 833 pure isolates in 2015. ITS comparison identified *F. oxysporum* and *F. verticillioides*; in addition, *F. proliferatum* and four other species of this genus not previously reported in the crop. By culture and morphological characteristics, *A. alternata* was identified and isolated from root and crown damaged tissue. This is a new report from other species of *Fusarium* and *Alternaria* associated to strawberry dry wilt in Guanajuato, Mexico.

Keywords: *Fragaria*×*ananassa*, *Fusarium pseudonygamai*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium verticillioides*.

INTRODUCTION

In Mexico, 9966 ha were planted with strawberry (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) during 2014. Production from the states of Michoacan (259 000 Mg), Baja California (146 000 Mg) and Guanajuato

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2016. Aprobado: enero, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 673-681. 2017.

INTRODUCCIÓN

En México, en el 2014 se sembraron 9966 ha con fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) y la producción de los estados de Michoacán (259 000 Mg), Baja California (146 000 Mg) y Guanajuato (29 000 Mg) fue el 94 % de la producción nacional. En ese año, el valor de la producción de esa fruta en Guanajuato fue de 124 millones de pesos (US\$ 9.3 millones) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2015). En dicho estado, el cultivo es susceptible a enfermedades fúngicas en raíz y corona, por lo cual la superficie sembrada disminuye cada año. La secadera de la fresa es la enfermedad más frecuente y genera la muerte gradual de la planta (Castro y Dávalos, 1990).

En la región central de México *Fusarium oxysporum* causa la enfermedad y es el hongo más frecuente porque se presenta desde etapas tempranas del cultivo y causa pérdidas mayores al 50 %, equivalente a 7.5 Mg ha⁻¹ (Dávalos *et al.*, 1992). Además de esta especie, *F. solani*, *F. moniliforme* (sin. *F. verticillioides*), *Phytophthora fragariae*, *Rhizoctonia solani*, *R. fragariae*, *Alternaria* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium alboatrum*, *Colletotrichum* spp., *Cylindrocladium* spp., y *Ramularia* spp., también se identifican como parte del problema y causan pérdidas significativas según las condiciones ambientales, manejo del cultivo y textura del suelo (Castro y Dávalos, 1990; Ceja *et al.*, 2008).

En el Laboratorio de Fitopatología del INIFAP-CEBAJ, en los análisis de plantas con síntomas típicos de secadera de la fresa se observaron diferencias culturales y morfológicas en aislados de *Fusarium* lo cual sugiere que más de una especie o una especie diferente a las reportadas está presente y causa la enfermedad. También se aisló al hongo *Alternaria* spp., en una frecuencia más alta que la de otros hongos de mayor importancia como *Verticillium* spp., y *Rhizoctonia* spp., pero no está identificado a nivel de especie (Mariscal, 2015^[1]). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue conocer la presencia actual de los hongos asociados con la enfermedad, calcular su frecuencia e identificarlos mediante características culturales, morfológicas y secuenciación de las ITS, e identificar otras especies asociadas con este problema

(29 000 Mg) was 94 % of the Mexican production. In that year, the value of the fruit production in the state of Guanajuato was 124 million pesos (9.3 million US dollars) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2015). In this state, the crop is susceptible to fungal diseases in root and crown, so plantings area decreases each year. Strawberry dry wilt is the most common disease and generates the gradual death of the plant (Castro and Dávalos, 1990).

In the central Mexico area, *Fusarium oxysporum* causes the disease, is the most common fungus because it occurs from early stages, and cause losses greater than 50 %, equivalent to 7.5 Mg ha⁻¹ (Dávalos *et al.*, 1992). Along with this species, *F. solani*, *F. moniliforme* (sin. *F. verticillioides*), *Phytophthora fragariae*, *Rhizoctonia solani*, *R. fragariae*, *Alternaria* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium alboatrum*, *Colletotrichum* spp., *Cylindrocladium* spp., and *Ramularia* spp., have also been identified as part of the problem and cause significant losses depending on the environmental conditions, crop management and soil texture (Castro and Dávalos, 1990; Ceja *et al.*, 2008).

Analyzes of plants with typical symptoms of strawberry dry wilt at the Phytopathology Laboratory of the INIFAP-CEBAJ, culture and morphological differences in *Fusarium* isolates suggested that more than one species or different species to those reported, were present and caused the observed disease. The fungus *Alternaria* spp. was also isolated more frequently than other more important fungi, such as *Verticillium* spp., and *Rhizoctonia* spp., but it is not yet identified to a species level (Mariscal, 2015^[1]). Therefore, the objective of this study, was to assess the current presence of the fungi associated with the disease, to estimate their frequency and identify it through cultural and morphological characteristics, and sequencing of ITS regions, but also identify other species associated with this phytosanitary problem in Guanajuato. Our hypothesis was that there are other species of fungi, different to those reported so far, that cause the strawberry dry wilt.

MATERIALS AND METHODS

During the spring-summer 2014 (PV/2014) and 2015 (PV/2015) growing season, plants of the 'Camino Real',

¹ Mariscal, A. L. A. Responsable del Laboratorio de Fitopatología del Instituto, Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Bajío.

fitosanitario en Guanajuato. La hipótesis fue que hay otras especies de hongos diferentes a las reportadas que causan la secadera de la fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el ciclo agrícola primavera-verano 2014 (PV/2014) y 2015 (PV/2015) se recolectaron plantas de los cultivares 'Camino Real', 'Festival', 'Albién', 'Portales', 'Camarosa' y 'San Andrés' con síntomas característicos de secadera de la fresa (marchitez, enanismo y clorosis) en parcelas comerciales de 34 localidades de tres municipios en Guanajuato. De las 170 muestras, 160 fueron del municipio de Irapuato, cinco de Abasolo y cinco de Salamanca. Los hongos aislados se purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos y por punta de hifa en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA, BD Bioxon®), 39 g L⁻¹ agua destilada adicionando 0.25 % de ácido láctico. De cada planta se obtuvieron ocho aislados puros, cuatro de tejido de raíz y cuatro de la corona.

La primera identificación se realizó de 511 aislados puros obtenidos del ciclo PV/2014 y 833 del ciclo PV/2015. Para la clasificación del género *Fusarium* se observó el crecimiento micelial y la pigmentación del medio de cultivo; y mediante preparaciones temporales, la caracterización de microconidios, macroconidios y clamidosporas. Las características culturales y morfológicas se compararon con las descripciones de Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006). Para los otros géneros de hongos se observó el tipo de crecimiento, color del micelio y la forma y tamaño de los conidios comparándolos con las descripciones de University of California (1994) y Anaya y Romero (2011). Debido a la cantidad alta de aislados clasificados dentro del género *Fusarium*, se seleccionó un aislado de cada localidad y se sembró en medio Hoja de Clavel-Agar (CLA) (HYCEL®), 20 g L⁻¹ agua destilada. Para una mejor comparación se sembró la cepa certificada *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* [IFO 31180 (8)] (ATCC®) en PDA y CLA.

Los aislados seleccionados se usaron para la identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de la región espaciadora transcrita (ITS). La extracción de ADN de cada aislado se realizó adaptando el protocolo de Lievens *et al.* (2003). Para la PCR se usó el oligonucleótido sentido ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes y Bruns, 1993) y el oligonucleótido antisentido ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) que delimitan al ITS1, la región 5.8 S y el ITS2 del hongo. La mezcla de reacción fue 25 ng de ADN, 1x regulador de PCR (SENNA®), 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM del oligonucleótido sentido, 1.0 µM del oligonucleótido antisentido y 1 U Taq ADN Polimerasa de Alta Fidelidad (SENNA®) en un volumen de

'Festival', 'Albién', 'Portales', 'Camarosa' and 'San Andrés' cultivars were collected. These had characteristic strawberry dry wilt symptoms (wilting, dwarfing and chlorosis). They were collected in 34 commercial plots located in three municipalities in the state of Guanajuato. From the 170 samples, 160 were from Irapuato, five from Abasolo and of five from Salamanca. Fungal isolates were purified using the monospore cultures and hyphal tip technique in Potato-Dextrose-Agar media (PDA, BD Bioxon®), 39 g L⁻¹ distilled water with a 0.25 % lactic acid addition. From each plant, eight pure isolates were obtained, four from the root and four from the crown tissue.

The first identification was made from 511 pure isolates obtained from the PV/2014 and 833 from the PV/2015 cycle. For the *Fusarium* genus classification, the mycelial growth and culture media pigmentation was observed; microconidia, macroconidia and chlamydospores characterization was performed by temporary preparations. Culture and morphological characteristics were compared with Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell (2006) descriptions. For the other fungi genera, the growth type, mycelium color and the shape and size of their conidia were compared with the descriptions of the University of California (1994) and Anaya and Romero (2011). Due to the high number of isolates classified in the *Fusarium* genus, one isolate from each location was selected and cultured in Carnation Leaf Agar (CLA) (HYCEL®), 20 g L⁻¹ distilled water. For better comparison, the certified strain of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* [IFO 31180 (8)] (ATCC®) was cultured in PDA and CLA.

The selected isolates were used for molecular identification by amplifying and sequencing the internal transcribed spacers (ITS). DNA extraction of each isolate was performed adapting the Lievens *et al.* (2003) protocol. For the PCR the ITS1-F oligonucleotide (direction 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes and Bruns, 1993) and the antisense ITS4 oligonucleotide (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) which delimit the ITS1, the 5.8 S and the ITS2 region of the fungus were used. The reaction mixture was 25 ng DNA, 1x PCR regulator (SENNA®), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of the sense oligonucleotide, 1.0 µM of the antisense oligonucleotide and 1 U Taq High Fidelity DNA Polymerase (SENNA®) in a 25 µL total volume. Amplification was done in a T100 thermocycler (Bio-Rad®) with the program: 1 cycle at 94 °C, for 2 min; 35 cycles at 94 °C, 45 s; 59 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 1 cycle at 72 °C, for 10 min. The products were purified with a Freeze 'N Squeeze™ kit DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad®) following the manufacturer's protocol. The purified products were sequenced at the Genomic Services Laboratory

25 μ L. La amplificación se hizo en un termociclador T100™ (Bio-Rad®) con el programa: 1 ciclo 94 °C, 2 min; 35 ciclos 94 °C, 45 s; 59 °C, 45 s; 72 °C, 90 s; 1 ciclo 72 °C, 10 min. Los productos se purificaron con el kit Freeze 'N Squeeze™ DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad®), según el protocolo del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron en el Departamento de Servicios Genómicos LANGE BIO, CINVESTAV-Campus Guanajuato con el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se compararon y alinearon con las de la base de datos del Gen Bank del NCBI, USA, mediante Nucleotide BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2015).

La frecuencia de aislamiento de los géneros de hongos por ciclo agrícola se calculó con la ecuación: Frecuencia (%) = (No. de aislados del género identificado / total de aislados analizados por ciclo) * 100 (Juber *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la identificación de hongos y su aislamiento desde tejido infectado de raíz y corona de plantas de fresa revelaron la presencia de tres géneros importantes ya reportados por Castro y Dávalos (1990) y Ceja *et al.* (2008). El género más frecuente fue *Fusarium* aislado de todas las plantas de todas las localidades en ambos ciclos agrícolas. La frecuencia de este género fue de 54 % en PV/2014 y 60 % en PV/2015 (Figura 1), resultados que coinciden con las frecuencias altas reportadas por Castro y Dávalos (1990) y Ceja *et al.* (2008), quienes aislaron a *Fusarium* spp., en 47 y 83 %, respectivamente. En PDA, este microorganismo mostró diferentes características culturales tales como pigmentaciones de color blanco, rosa, salmón, rojo, magenta y violeta, las cuales se tornaron más oscuras con la edad, y en algunos casos, abundante micelio algodonoso y esparcido en la caja Petri. En CLA no se produjeron pigmentaciones en ningún aislado pero se presentaron esporodocios color amarillo, amarillo cremoso y naranja pálido sobre las hojas de clavel. Mediante el análisis microscópico se observaron microconidios abundantes, hialinos, ovoides a elipsoidales con 0-1 septa (Figura 2 J) de 1.8-3.8 $\times$ 2.06-12.0 μ m. Se observaron al menos cuatro tipos de macroconidios de 1.68-4.0 $\times$ 12.4-41.5 μ m con 3-4 septas (Figura 2 B-I). La mayoría de los macroconidios fueron hialinos, curvos con una célula apical curva y una célula basal en forma de pie (Figura 2 E), algunos con características similares a los macroconidios de *F. oxys-*

LANGEBIO, CINVESTAV-Guanajuato Campus, using the Sanger method. The obtained sequences were compared and aligned with the NCBI, USA, GenBank database, with the Nucleotide BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2015).

The isolation frequency of the fungi genera by agricultural cycle was calculated using the equation: Frequency (%) = (Number of isolates from the identified genus / total isolates analyzed per cycle) * 100 (Juber *et al.*, 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the fungi identification and their isolation from root and crown infected tissue from strawberry plants revealed the presence of three major genera already reported by Castro and Dávalos (1990) and Ceja *et al.* (2008). The most frequent genus was *Fusarium* isolated from all plants from all locations in both evaluated agricultural cycles. The frequency of this genus was 54 % in the PV/2014 and of 60 % in the PV/2015 (Figure 1). These results match the high frequencies reported by Castro and Dávalos (1990) and Brow *et al.* (2008), who isolated *Fusarium* spp., in 47 % and 83 %, respectively. In PDA, this microorganism showed

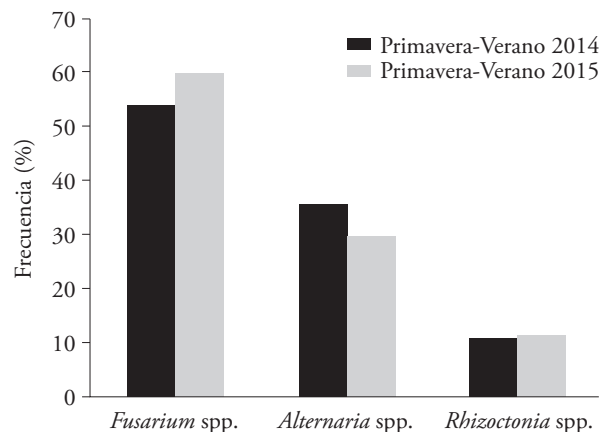


Figura 1. Frecuencia en porcentaje de *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., y *Rhizoctonia* spp., en 511 aislados de tejido infectado de raíz y corona de fresa en el ciclo agrícola primavera-verano 2014 y 833 aislados en el ciclo primavera-verano 2014.

Figure 1. Frequency in the percentage of *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., and *Rhizoctonia* spp., in 511 isolates from root and crown infected tissue of strawberries from the 2014 spring-summer growing season and 833 isolates from the 2014 spring-summer season.

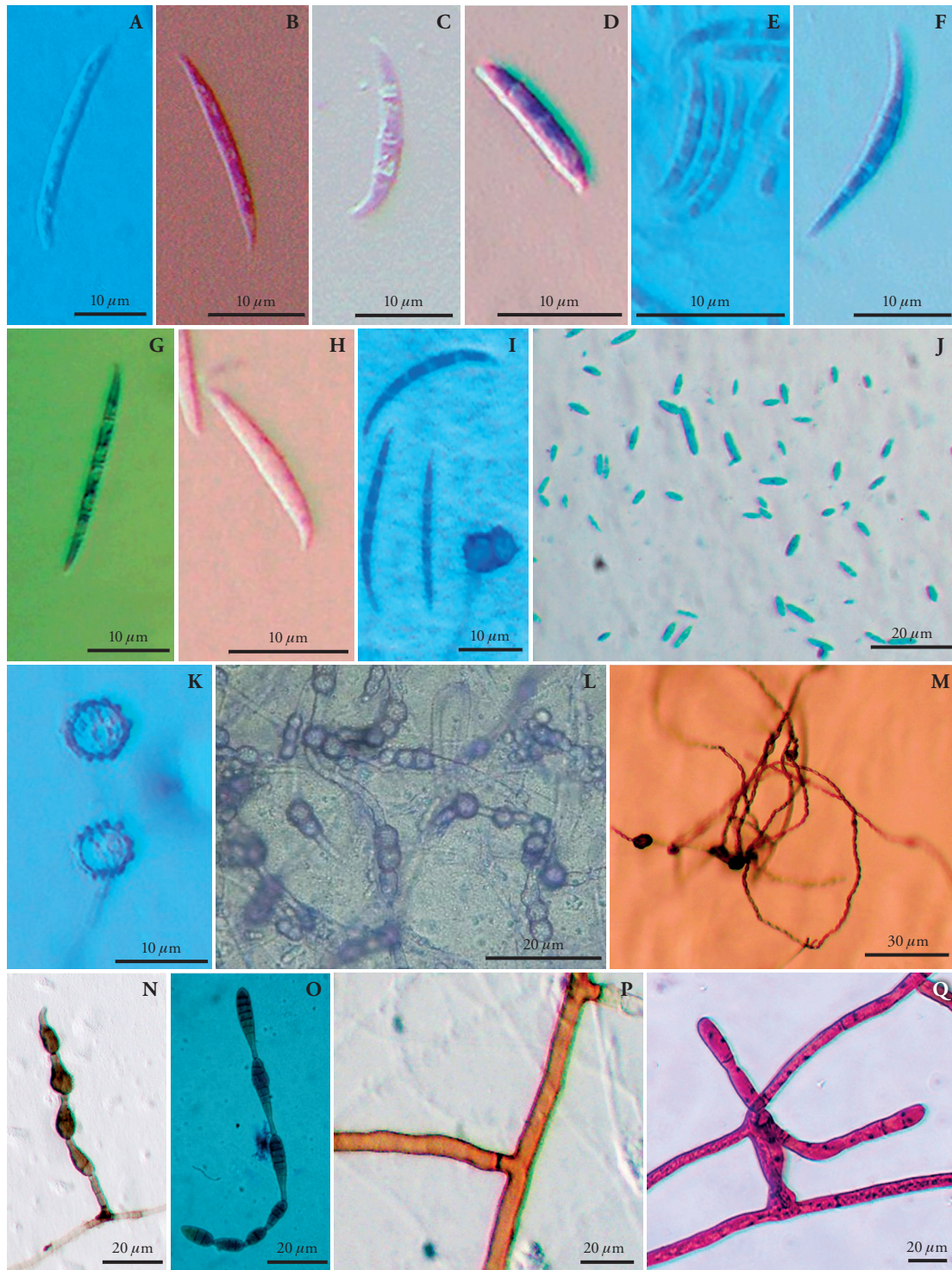


Figura 2. Micrografías de *Fusarium* spp.; diferentes tipos de macroconidios (A-I); microconidios (J); clamidosporas (K-L); microconidios en cadenas largas (M); *Alternaria* spp., con dos tipos de conidios (N-O), y *Rhizoctonia* spp., con hifas en ángulo de 90° (P) y múltiples núcleos (flechas) (Q).

Figure 2. Micrographs of *Fusarium* spp.; different types of macroconidia (A-I); microconidia (J); chlamydospores (K-L); microconidia in long chains (M); *Alternaria* spp., with two types of conidia (N-O), and *Rhizoctonia* spp., hyphae with 90° (P) and multiple cores (arrows) (Q).

porum f. sp. *fragariae* [IFO 31180 (8)] (ATCC®) de $1.68\text{--}2.60 \times 17.70\text{--}30.60 \mu\text{m}$ (Figura 2 A). Algunos aislados produjeron abundantes clamidosporas de forma terminal o intercaladas en el micelio, solitarias o en cadenas de 3-7 células con paredes rugosas y verrugosas (Figura 2 K, L). Estas características culturales y morfológicas coincidieron con las descritas por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) para especies de este género y en algunos aislados para la especie *F. oxysporum*.

El género *Alternaria* fue el segundo más frecuente en ambos ciclos: 36 % en PV/2014 y 29 % en PV/2015 (Figura 1). Estas frecuencias coincidieron en parte con las reportadas por Castro y Dávalos (1990) donde *Alternaria* spp. se aisló en 5-12 % y fue el tercer hongo más frecuente después de *Fusarium* spp., y *Verticillium* spp. En PDA, los aislados mostraron un crecimiento micelial algodonoso color blanco que se tornó gris y café oscuro con la edad. Se observaron dos tipos de conidios, los primeros fueron cortos, en cadenas de 3-5 células, a menudo con tres septas, ovoides, color café claro, con paredes lisas y una célula apical cónica corta (Figura 2 N). Los segundos fueron conidios más largos, en cadenas de 6-8 células, a menudo con seis septas, color café claro, con paredes lisas y con una célula apical cónica (Figura 2 O), de $4.0\text{--}8.8 \times 9.6\text{--}22.5 \mu\text{m}$. Las características de los primeros conidios (Figura 2 N) fueron similares a las descritas por Simmons (2007) para la especie *A. alternata*. En otros estudios se aisló *Alternaria* spp., de raíces y coronas infectadas, pero esta especie no causó infección en estas partes de la planta.

El género menos frecuente fue *Rhizoctonia* con 11 % en ambos ciclos agrícolas (Figura 1); Castro y Dávalos (1990) y Ceja *et al.* (2008) reportaron también este género como el menos frecuente con 2-15 % y 2-10 %, respectivamente, lo cual coincide con las frecuencias bajas calculadas en nuestro estudio. En PDA, los aislados mostraron un crecimiento micelial ligeramente anillado con un color de micelio blanco a café claro. El hongo produjo hifas típicas con ramificaciones en ángulo recto (90 °C), con una ligera constricción de la hifa al inicio de la ramificación y las dos septas distintivas, una en la hifa principal y la otra en la ramificación (Figura 2 P). La tinción de hifas con safranina indicó la presencia de hifas multinucleadas que corresponde con la especie *R. solani* (Figura 2 Q) (UC, 1994; Anaya y Romero, 2011).

different culture characteristics such as white, pink, salmon, red, magenta and violet pigmentations, which became darker with age, and in some cases, abundant cottony mycelium scattered along the Petri dish. Pigmentations in CLA did not occur in any isolates but, yellow, creamy yellow and pale orange sporodochia appeared over the carnation leaves. By microscopic analysis abundant hyaline and ovoid to ellipsoidal microconidia were detected, with 0-1 septa (Figure 2 J) of $1.8\text{--}3.8 \times 2.06\text{--}12.0 \mu\text{m}$. At least four types of macroconidia were observed of $1.68\text{--}4.0 \times 12.4\text{--}41.5 \mu\text{m}$ with 3-4 septa (Figure 2 B-I). Most macroconidia were hyaline, curved with a curve apical cell and a foot-shaped basal cell (Figure 2E), some with similar macroconidia characteristics of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* [IFO 31180 (8)] (ATCC®) measuring $1.68\text{--}2.60 \times 17.70\text{--}30.60 \mu\text{m}$ (Figure 2A). Some isolates produced abundant terminal chlamydoconidia or interleaved in the mycelium, solitary or in 3-7 cell chains with roughened warty cell walls (Figure 2 K, L). These culture and morphological characteristics coincided with those described by Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell (2006) for species of this genus and in some isolated for *F. oxysporum*.

The genus *Alternaria* was the second most common in both cycles: 36 % in the PV/2014 and 29 % in the PV/2015 (Figure 1). These frequencies partially coincided with those reported by Castro and Dávalos (1990) where *Alternaria* spp. was isolated in 5 % to 12 % and the third most common fungus after *Fusarium* spp., and *Verticillium* spp. In PDA, the isolates showed a white color cottony mycelial growth which turned gray and dark brown with age. Two types of conidia were observed, the first were short, in 3-5 cell chains, often with three septa, ovoid, light brown, with smooth walls and a short conical apical cell (Figure 2 N). The latter, were longer conidia in 6-8 cell chains, often with six septate, brown clear, smooth walls and a conical apical cell (Figure 2 O), of $4.0\text{--}8.8 \times 9.6\text{--}5.22 \mu\text{m}$. The characteristics of the first conidia (Figure 2 N) were similar to those described by Simmons (2007) for *Alternata*. In other studies, *Alternaria* spp. was isolated from infected roots and crowns, but this species did not cause infection in these parts of the plant.

Rhizoctonia was the less frequent genus with 11 % in both agricultural cycles (Figure 1); Castro

Los amplicones obtenidos con el oligonucleótido sentido ITS1-F y el oligonucleótido antisentido ITS4, a partir de ADN de los aislados seleccionados de *Fusarium*, tuvieron un tamaño aproximado de 600 a 850 pb (Figura 3). La secuencia de 34 ITS de los aislados seleccionados fue obtenida. Por su tamaño (>200 pb), solo 15 secuencias fueron almacenadas en el Gen Bank; nueve de ellas (números de acceso: KT183399, KT183401, KT183402, KT183404, KT183405, KT183406, KT183408, KT183409 y KT1834-10) tuvieron una homología de 99-100 % con la mayoría de las secuencias de *F. oxysporum*, y la secuencia KT183403 tuvo una homología de 100 % con la especie *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Las últimas cinco secuencias (KT183400, KT183407, KT183411, KT183412 y KT183413) tuvieron porcentajes de homología con *F. verticillioides* (100 %), *F. pseudonygamai* (100 %), *F. fujikuroi* (100 %), *F. proliferatum* (100 %) y *F. brachygibbosum* (99 %). Por asociación entre las dos técnicas de identificación y las características de los macroconidios de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Figura 2 A), los macroconidios de la Figura 2 B, C, D y E, correspondieron a *F. oxysporum*. Los macroconidios (Figura 2 G) y las cadenas largas de microconidios (Figura 2 M) coinciden en características con las de *F. verticillioides*; y los macroconidios (Figura 2 H) y las características culturales del aislamiento de donde se extrajeron coinciden con *F. proliferatum* (Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006; Pitt y Hocking, 2009).

and Dávalos (1990) and Ceja *et al.* (2008) also reported this genre as less frequent with 2-15 % and 2-10 % each, respectively, which coincides with the low frequencies calculated in our study. Isolates in the PDA showed a slightly ringed mycelial growth with white to light brown mycelium. The fungus produced typical hyphae with branches in right angles (90 °C), with a slight constriction of the hyphae at the beginning of the branch and the two distinct septa, one in the main hyphae and the other in the branch (Figure 2 P). Hyphae staining with safranin indicate the presence of multinucleated hyphae, which correspond to the *R. solani* species (Figure 2 Q) (UC, 1994; Anaya and Romero, 2011).

Amplicons obtained with the sense oligonucleotide ITS1-F and the antisense ITS4 oligonucleotide, from DNA of the selected *Fusarium* isolates were approximately 600 to 850 bp (Figure 3). The 34 ITS sequence from the selected isolates was obtained. Due to its size (>200 bp), only 15 sequences were stored in the GenBank; nine of them (accession numbers: KT183399, KT183401, KT183402, KT183404, KT183405, KT183406, KT183408, KT183409 and KT1834-10) had a 99-100 % homology with most sequences of *F. oxysporum*. The sequence KT183403 had a 100 % homology with the *F. oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* species. The last five sequences (KT183400, KT183407, KT183411, KT183412 and KT183413) had homology percentages with *F. verticillioides* (100 %), *F. pseudonygamai* (100 %), *F.*



Figura 3. Amplificación de ITS de aislados de *Fusarium* spp., con el oligonucleótido sentido ITS1-F y el oligonucleótido antisentido ITS4; M=marcador de tamaño 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®); carril 1-13, muestras de *Fusarium* spp.; los fragmentos amplificados se muestran con una flecha.

Figure 3. Amplification of ITS isolates from *Fusarium* spp., with the ITS1-F direction oligonucleotide and ITS4 antisense oligonucleotide; M=marker of 1 kb size Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®); lane 1-13, *Fusarium* spp., samples; the amplified fragments are shown with an arrow.

Las especies diferentes de *Fusarium* identificadas en nuestro estudio indican que la secadera de la fresa es causada por un complejo de especies, de las que se han identificado y aislado de tejido infectado de raíz y corona a *F. solani* (Ceja *et al.*, 2008), *F. verticillioides* (Téliz *et al.*, 1986) y *F. oxysporum* (el más común) (Castro y Dávalos, 1990). Sin embargo, es necesario hacer pruebas de patogenicidad con las otras especies de este género identificadas molecularmente: *F. pseudonygamai*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. brachygibbosum*, que no están reportadas como causantes de esta enfermedad en el cultivo al igual que *A. alternata*. Las especies *F. solani*, *Cylindrocarpon* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora* sp., *Verticillium* spp., *Phoma* spp., y *Colletotrichum* spp., reportadas por Castro y Dávalos (1990) y Ceja *et al.* (2008) en Guanajuato, no se identificaron en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

Los géneros más abundantes son *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Alternaria* de los cuales *Fusarium* con la especie *Fusarium oxysporum* es el más frecuente. El segundo y tercer género más frecuente fue *Alternaria*, con la especie *A. alternata* y *Rhizoctonia*, identificados con su aislado y morfología. Las diversas características culturales y morfológicas y la comparación e identificación mediante ITS de siete especies de *Fusarium* sugieren que la secadera de la fresa es causada por un complejo de especies y por otros hongos diferentes no reportados.

LITERATURA CITADA

- Anaya, R. S., y J. Romero N. 2011. Hortalizas Plagas y Enfermedades. Primera edición. Editorial Trillas. México, D. F. pp: 53-63.
- Castro, F. J., y P. Dávalos G. 1990. Etiología de "la secadera" o pudrición de la raíz y corona de la fresa en Irapuato, Gto. Rev. Mex. Fitopatol. 8: 80-86.
- Ceja, T. L. F., G. Mora A., D. Téliz, A. Mora A., P. Sánchez G., C. Muñoz R., B. Tlapal B., y R. de la Torre A. 2008. Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera en la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico. Agrociencia 42: 451-461.
- Dávalos, G. P., J. Castro F., E. Redondo J., H. Rodríguez G., G. Díaz C., y A. Arévalo V. 1992. Guía para cultivar fresa en Irapuato. Folleto para productores No. 1. INIFAP-CIAP-SARH. México, D. F. 52 p.
- 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.
- fujikuroi* (100 %), *F. proliferatum* (100 %) and *F. brachygibbosum* (99 %). By association between the two identification techniques and characteristics of the macroconidia of *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Figure 2 A), macroconidia in Figure 2 B, C, D and E, corresponded to *F. oxysporum*. Macroconidia (Figure 2 G) and the long chains of microconidia (Figure 2 M) correspond with the characteristics from *F. verticillioides*; the macroconidia (Figure 2H) and the culture characteristics of the isolates from which they were extracted, matched those of *F. proliferatum* (Nelson *et al.*, 1983; Leslie and Summerell, 2006; Pitt and Hocking, 2009).
- Different species of *Fusarium* identified in our study indicate that strawberry dry wilt is caused by a species complex; these were identified and isolated from infected root and crown tissue and include: *F. solani* (Ceja *et al.*, 2008), *F. verticillioides* (Téliz *et al.*, 1986) and *F. oxysporum* (most common) (Castro and Dávalos, 1990). However, it is necessary to tests the pathogenicity with other species of this genus molecularly identified: *F. pseudonygamai*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, and *F. brachygibbosum*, which have not been reported to cause disease in the crop, unlike *A. alternata*. The species of *F. solani*, *Cylindrocarpon* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora* sp., *Verticillium* spp., *Phoma* spp., and *Colletotrichum* spp., reported by Castro and Dávalos (1990) and Ceja *et al.* (2008) in Guanajuato, were not identified in our study.

CONCLUSIONS

The most abundant genera are *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Alternaria* of which *Fusarium oxysporum* from the *Fusarium* species is the most common. The second and third most common genre were *Alternaria*, with the species *A. alternata* and *Rhizoctonia*, isolated and identified by their morphology. The various culture and morphological characteristics along the comparison and identification by ITS of seven *Fusarium* species suggest that strawberry dry wilt is caused by a complex of different species and other fungi not reported.

—End of the English version—



- Juber, S. K., H. Al-Juboory H., and S. Al-Juboory B. 2014. *Fusarium* wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* in Iraq and its control. J. Exp. Biol. Agr. Sci. 2: 419-427.
- Leslie, F. J., and B. Summerell A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First Edition. Blackwell Publishing. Manhattan, USA. 388 p.
- Lievens, B., M. Brouwer, C. A. Vanachter C. R., A. Lévesque C., B. Cammue P. A., and H. J. 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.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2015. GenBank. www.ncbi.nlm.nih.gov. (Consulta: noviembre, 2015).
- Nelson, E. P., A. W. Toussoun T., and O. Marasas F. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- Pitt, I. J., and A. Hocking D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Third edition. Springer. New York, USA. 519 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estado 2014. www.siap.gob.mx (Consulta: noviembre, 2015).
- Simmons, G. E. 2007. *Alternaria: an Identification Manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands. 775 p.
- Téliz, O. D., A. Mendoza H., y J. Sandoval. 1986. Enfermedades de la fresa en México. Rev. Mex. Fitopatol. 4: 1-12.
- University of California (UC). 1994. Integrated Pest Management for Strawberries. IPM Education and Publications. California, USA. 142 p.
- White, T. J., T. Burns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. San Diego, California. pp: 315-322.