



## Artículo / Article

# Identificación molecular del complejo *Botryosphaeria* sp. asociado a canchros y secamiento de yemas en *Eucalyptus* sp.

## Molecular identification of the *Botryosphaeria* sp. complex related to cankers and drying of buds in *Eucalyptus* sp.

Dany Gabriel Santiago Santiago<sup>1</sup>, Ernestina Valadez Moctezuma<sup>2</sup> y David Cibrián Tovar<sup>1</sup>

### Resumen

Los problemas fitosanitarios afectan de manera drástica al cultivo o a la planta de eucalipto, por los daños que le producen. *Botryosphaeria* sp. está asociado a canchros y secamiento de yemas, muerte descendente, pudrición de frutos, pudrición del cuello y *damping-off* en plántulas, lo que es particularmente importante en las plantaciones comerciales de *Eucalyptus* para obtener madera en ciclos cortos. Con el objetivo de caracterizar e identificar a nivel molecular aislamientos de este hongo, en el trabajo que se describe a continuación se estimó, por un lado, la variabilidad genética en muestras enfermas con marcadores genómicos tipo ISSR, y por otro, se secuenció y comparó la región ITS. Los ISSR fueron analizados con técnicas multivariadas para agrupar a los aislamientos con base en su similitud genética, de lo que resultó que la mayoría de las muestras fueron muy similares entre sí, a nivel de genoma. Los resultados de la técnica de secuenciación de las regiones ITS indicaron la presencia de *Neofusicoccum* sp., *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia corticola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum eucalyptorum* y *Neofusicoccum* sp. En relación con los nucleótidos de la región secuenciada, la cantidad de polimorfismos entre los aislamientos estudiados y aquellos que se usaron como *outgroups*, obtenidos del *GenBank*, fue mínimo.

**Palabras clave:** ADN, canchros, ISSR, MEGA, secuencias ITS, UPGMA.

### Abstract

Phytopathological problems drastically affect the production or the plants of *Eucalyptus* sp. from the damages that they bring. *Botryosphaeria* sp. is associated with cankers and drying buds, dieback, fruit rot, collar rot and damping off in seedlings, which is especially important in commercial plantations that use these species for lumber in short cycles. In order to characterize and identify at the molecular level isolates of this fungus, in the work described below is estimated, first, the genetic variability in diseased samples with genomic markers of the ISSR type, and secondly, the ITS region was sequenced and compared. The ISSR markers were analyzed with multivariate techniques to group the isolates based on their genetic similarity, of what turned out that most of the samples were very similar to each other at the genome. The results of the sequencing technique IST regions indicated the presence of *Neofusicoccum* sp., *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia corticola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum eucalyptorum* and *Neofusicoccum* sp. It is noteworthy that at the nucleotide level of the sequenced region, the quantity of polymorphisms among the isolates studied and those that were used as *outgroups* obtained from *GenBank*, was minimal

**Key words:** DNA, cankers, ISSR, MEGA, ITS sequence, UPGMA.

Fecha de recepción/date of receipt: 24 de septiembre de 2015; Fecha de aceptación/date of acceptance: 12 de noviembre de 2015.

<sup>1</sup> Maestría en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Correo-e: evaladez@correo.chapingo.mx

## Introducción

El uso de especies forestales introducidas ofrece, en la mayoría de los casos, ventajas respecto a las nativas, con respecto a la velocidad de crecimiento y a los turnos de aprovechamiento, que son más breves; ambos criterios son fundamentales para desarrollar proyectos forestales viables, desde el punto de vista financiero. Los taxa de *Eucalyptus* son utilizados para obtener madera en ciclos cortos, pero las plantaciones son afectadas por patógenos e insectos; el hongo *Botryosphaeria* es causante de enfermedades severas en este tipo de árboles.

En México existen plantaciones comerciales de eucalipto de rápido crecimiento (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. nitens* Deane & Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. urophylla* S. T. Blake y el híbrido *E. urophylla* x *grandis* (*E. urograndis*) (Velázquez *et al.*, 2013) establecidas en el Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Veracruz.

De ese conjunto de especies destacan *E. nitens* y *E. globulus* en ambientes de mayor altitud con tendencia a heladas y *E. urophylla* en el trópico húmedo (Conafor, 2012). Entre 2010 y 2012 se hicieron plantaciones con los primeros dos taxa en el estado de Michoacán, en las cuales se registró mortalidad en árboles con edades de tres a cuatro años; los organismos involucrados en los tejidos muertos o enfermos fueron hongos pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes) (De la Mora *et al.*, 2014). En el sur de Veracruz, en plantaciones de *E. urophylla* y *E. grandis* se informó de la existencia de *B. rhodina* (Berk. & M. A. Curtis, 1970) como causante de muerte descendente; los árboles afectados mostraron enredamiento de raíz, por lo que se presume que los hongos tuvieron un rol de patógeno oportunista (Cibrián, 2013).

Los hongos de esta familia tienen amplia distribución en el mundo y afectan a un grupo diverso de plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas (Smith *et al.*, 2001; Mohali *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009, Pérez *et al.*, 2010). Los géneros *Botryosphaeria* y *Neofusicoccum* son patógenos endófitos, oportunistas, que inducen canchros en tallo y ramas, muerte descendente, pudrición de frutos, pudrición del cuello y *damping-off* en plántulas (Mohali *et al.*, 2006; Slippers y Wingfield, 2007).

Originalmente del género *Neofusicoccum* se habían reconocido 13 especies, pero el número crece conforme se hacen estudios adicionales (Sakalidis *et al.*, 2011). Las técnicas moleculares basadas en marcadores de ADN y secuenciación son un gran apoyo para la taxonomía de los organismos. En particular los marcadores ISSR se han usado con mucho éxito por los resultados que ofrecen y la relativa facilidad con la que se obtienen. Para fines de identificación molecular, la

## Introduction

The use of forest exotic species offers, in most cases, the advantages over native species, in regard to the growth rate and cutting shifts, the latter which tend to be shorter; both criteria are essential to develop viable forest projects from the financial point of view. *Eucalyptus* species are used to get timber in short cycles but plantations are affected by pathogens and insects; *Botryosphaeria* fungus is causing severe diseases in such trees.

In Mexico there are commercial plantations of fast-growing eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. nitens* Deane & Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. urophylla* S. T. Blake and the *E. urophylla* x *grandis* (*E. urograndis*) hybrid (Velázquez *et al.*, 2013) established in the Estado de México, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Tabasco and Veracruz.

From this group of species, *E. nitens* and *E. globulus* are outstanding in environments at higher altitude prone to frost and *E. urophylla* in the humid tropics (Conafor, 2012). In the years 2010-2012, the first two taxa were used in plantations in the state of Michoacán, where mortality was recorded in trees aged three to four years old; the organisms involved in the dead or diseased tissues were fungi belonging to the Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes) family (De la Mora *et al.*, 2014). In southern Veracruz, in plantations of *E. grandis* and *E. urophylla* the existence of *B. rhodina* (Berk. & M. A. Curtis, 1970) was noted as the causing agent of dieback; the damaged trees showed root entanglement, so it is presumed that the fungi played a role of opportunistic pathogen (Cibrián, 2013).

Fungi of this family are widespread in the world and affect a diverse group of Dicotyledoneae, Monocotyledoneae and gymnosperms (Smith *et al.*, 2001; Mohali *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2009, Pérez *et al.*, 2010). *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* genera are endophyte pathogens, opportunists, inducing cankers on stems and branches, dieback, fruit rot, collar rot and damping off in seedlings (Mohali *et al.*, 2006; Slippers and Wingfield, 2007).

Originally 13 species were determined for the *Neofusicoccum* genus number grows as additional studies are made (Sakalidis *et al.*, 2011). The molecular techniques based on DNA markers and sequencing are very supportive of the taxonomy of organisms. ISSR markers in particular have been used with great success by the results they offer and the relative ease with which they are obtained. For purposes of molecular identification, sequence comparisons or regions of genes associated with phylogeny (for example, ITS zones) it has revolutionized the current taxonomy of many eukaryotic organisms and are widely used (Jin *et al.*, 2003; Awasthi *et al.*, 2004).

comparación de secuencias o regiones de genes asociados a filogenia (por ejemplo, las zonas ITS) ha revolucionado la taxonomía actual de muchos organismos eucariontes y son ampliamente utilizadas (Jin *et al.*, 2003; Awasthi *et al.*, 2004).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar, comparar e identificar molecularmente aislamientos de *Botryosphaeria* sp., asociados a canchros y secamiento de yemas aislados de *Eucalyptus* sp., debido a la trascendencia de dichos hongos en las plantaciones forestales, urbanas, de restauración, agroforestales y comerciales.

## Materiales y Métodos

### Recolección de muestras

Se trabajó con 14 muestras de eucaliptos con síntomas de canchros, de las cuales se consideraron solo aquellas con características de *Botryosphaeria* sp. Nueve se obtuvieron de parcelas de la empresa Forestaciones Operativas de México S. A. de C. V. (REXCEL) (EFOMSA) y cinco de parcelas de la empresa Forestales PROTEAK durante 2013 y 2014 (Cuadro 1).

The aim of this study was to characterize, compare and identify molecularly isolates of *Botryosphaeria* sp., associated with cankers and drying of isolated buds of *Eucalyptus* sp., due to the importance of these fungi in the forest, urban, restoration, agroforestry and commercial plantations.

## Materials y Methods

### Sample collection

The assays were made with 14 *Eucalyptus* samples with canker symptoms, from which only those with *Botryosphaeria* sp. were taken into account. Nine came from plots of *Forestaciones Operativas de México S. A. de C. V.* (REXCEL) (EFOMSA) company and five from *Forestales PROTEAK* company during 2013 and 2014 (Table 1).

### Isolation and purification of the fungal isolates

Samples were disinfected with commercial 3 % sodium hypochlorite for 5 minutes; they were rinsed three times in sterile distilled water for 5 min each; they were dried with sterile absorbent

Cuadro 1. Sitios de muestreo de diferentes especies de eucalipto y claves usadas en el presente estudio.

Parcelas de muestreo	Claves	Especie de <i>Eucalyptus</i>	Lugar de origen
EFOMSA Parcela 1	AG-C I 114	<i>Eucalyptus nitens</i> Deane & Maiden	Ciudad Hidalgo
EFOMSA Parcela 1	AG-C I 55		Ciudad Hidalgo
EFOMSA Parcela 1	AG-C		Ciudad Hidalgo
EFOMSA Parcela 2	JA-S		Tuxpan
EFOMSA Parcela 2	MI-T I2		Tuxpan
EFOMSA Parcela 3	ED-PM I 43		Irimbo
EFOMSA Parcela 3	MAR		Irimbo
EFOMSA Parcela 4	FR-M	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Maravatío
EFOMSA Parcela 4	RA-A		Maravatío
PROTEAK Parcela 5	VC1	<i>Eucalyptus urophylla</i> S. T. Blake	Las Choapas
PROTEAK Parcela 5	VC2		Las Choapas
PROTEAK Parcela 5	VC3		Las Choapas
PROTEAK Parcela 5	VC4		Las Choapas
PROTEAK Parcela 5	VC5		Las Choapas



Table 1. Sampling sites of *Eucalyptus* species and keys used in the actual study.

Sampling plots	Keys	<i>Eucalyptus</i> species	Place of origin
EFOMSA Plot 1	AG-C I 114	<i>Eucalyptus nitens</i> Deane & Maiden	Ciudad Hidalgo
EFOMSA Plot 1	AG-C I 55		Ciudad Hidalgo
EFOMSA Plot 1	AG-C		Ciudad Hidalgo
EFOMSA Plot 2	JA-S		Tuxpan
EFOMSA Plot 2	MI-T I2		Tuxpan
EFOMSA Plot 3	ED-PM I 43		Irimbo
EFOMSA Plot 3	MAR		Irimbo
EFOMSA Plot 4	FR-M	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Maravatío
EFOMSA Plot 4	RA-A		Maravatío
PROTEAK Plot 5	VC1	<i>Eucalyptus urophylla</i> S. T. Blake	Las Choapas
PROTEAK Plot 5	VC2		Las Choapas
PROTEAK Plot 5	VC3		Las Choapas
PROTEAK Plot 5	VC4		Las Choapas
PROTEAK Plot 5	VC5		Las Choapas

### Aislamiento y purificación de los aislamientos de hongos

Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (3 %) por 5 minutos; se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril por 5 min cada vez; se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron tres secciones de cada muestra en medio de cultivo papa-dextrosa-agar 2 % (PDA, Bioxon) e incubaron a 25 ± 2 °C (consideradas como repeticiones, lo que hizo un total de 42 muestras), que se mantuvieron en las mismas condiciones durante 10 días. La purificación de cada aislamiento con características de *Botryosphaeria* sp. se realizó mediante punta de hifa, para lo cual, una vez desarrollado el micelio en PDA, una sección de aproximadamente 1 mm fue sembrada en cajas Petri con medio Agar-Agua (AA) y mantenido 24 h a la misma temperatura. El AA es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy rala; el objetivo de utilizar este medio fue para tener mayor precisión al tomar la fracción de la hifa. Al mismo tiempo, otra sección de la misma, de aproximadamente 1 mm, se transfirió a medio de cultivo de Extracto de Malta-Agar 2 % (EMA) y se mantuvo un periodo de 20-30 días para su desarrollo en las condiciones de temperatura antes mencionadas.

### Caracterización morfológica

A partir de los aislamientos desarrollados en el medio de cultivo EMA, se evaluaron la coloración de micelio y el tipo de crecimiento del hongo. En los aislamientos AG-C I 114, ED-PM I 43 y FR-M a los 25 días se observó la presencia de

paper and three sections of each sample were sown in potato-dextrose agar 2 % (PDA, Bioxon) culture medium at 25 ± 2 °C (considered as replications, which made a total of 42 samples) which were maintained for 10 days. Purification of each isolate characteristics of *Botryosphaeria* sp. was performed by hyphae tip, for which, once the mycelium developed in PDA, a section of about 1 mm was sown in Petri dishes with water agar (AA, for its acronym in Spanish) medium and kept for 24 h at the same temperature. AA is a poor culture medium in which the mycelium grows in a very thin form, and in order to grow the mycelia in it was to achieve greater accuracy when taking the fraction of the hyphae. At the same time, another section of it about 1 mm was transferred to Malt Extract-Agar 2 % (MEA) culture medium and kept so for 20-30 days for its development in temperature conditions similar to those mentioned before.

### Morphological characterization

From the isolates developed in MEA culture medium, the mycelium color and the type of fungus growth were evaluated. In the AG-C I 114, ED-PM I 43 and FR-M isolates at day 25 the presence of black globular pycnidia covered by gray mycelium were observed but without the formation of conidia. These samples were processed according to Slippers and Wingfield (2007), who stated that in order to induce the formation of conidia in pycnidia the fungus should be grown in the AA or MAE medium supplemented with pine needles or small pieces of tissue from the host at 25 °C. The FR-M sample (plot 4) was used for the identification of such structures through slides from a Carl Zeiss compound microscope with the HardWare

picnidios negros, globulares, cubiertos de micelio de color gris, pero sin la formación de conidios. Estas muestras se procesaron de acuerdo a Slippers y Wingfield (2007), quienes señalan que para inducir la formación de conidios en picnidios se debe cultivar el hongo en medio AA o EMA suplementado con acículas de pino o pequeños trozos de tejido del hospedante, a 25 °C. La muestra FR-M (parcela 4) se utilizó para la identificación de dichas estructuras, a través de preparaciones microscópicas con un microscopio compuesto *Carl Zeiss* y el programa *HardWare Setup*, *Microscope: Leica DM2500*, *Test None*. *Image-Source: Leica DCF/DVM/ICD/IC3D Camera (Firewire A/B)*. En el caso del género, se realizó con las claves de Barnett y Hunter (1998) y de Sivanesan (1984) y para la especie se hizo con base en su morfología, de acuerdo a Smith *et al.* (2001).

## Caracterización e identificación molecular

Con la finalidad de comparar la variabilidad genética de las 42 muestras del hongo en estudio, se obtuvieron huellas de ADN tipo ISSR. El ADN se extrajo de los cultivos monoconidiales purificados en EMA con el protocolo CTAB I, a partir de las recomendaciones de Weising *et al.* (2005). La calidad del ADN se verificó en gel de agarosa 1.2 % en amortiguador TAE 1X (Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0). El ADN de alto peso molecular se visualizó en un transiluminador modelo *Universal Hood II (Bio-Rad)* y su concentración se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop (Lambda Bio 12 Perkin Elmer)*.

## Desarrollo de Marcadores ISSR

Se utilizaron los iniciadores  $(AC)_8YG$ ,  $(GA)_8YC$ ,  $(GACA)_4$ ,  $(GGAT)_4$  y  $(GATA)_4$  para caracterizar los aislamientos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción contenía Buffer 1X,  $MgCl_2$  2.5 mM, Taq ADN polimerasa 1.5 U (Promega), dNTP 200  $\mu$ M, Iniciador 20 pM, ADN 100 ng y agua.

## Condiciones de termociclaje

Las muestras se amplificaron en el termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* bajo el siguiente programa: un ciclo a 95 °C, 3 min; 35 ciclos [95 °C, 30 seg; 56 °C, 45 seg; 72 °C, 2 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. La temperatura de alineamiento para los iniciadores  $(GACA)_4$ ,  $(GGAT)_4$  y  $(GATA)_4$  fue de 48 °C. Para la separación de los fragmentos amplificados se trabajó en una cámara vertical C.B.S. *Scientific CO*® modelo *MVG-216-33* con una fuente de poder *E-C Apparatus Corporations*®, Modelo *EC-105*. El gel de acrilamida fue de 6 %, y se corrió a 245 voltios por 2.5 h, aproximadamente. Se utilizaron 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular 100 pb ADN (Promega) y 3  $\mu$ L del marcador de 1 kb *O'GeneRuler*™ (Fermentas) con fines de ubicación de bandas.

Setup, *Microscope: Leica DM2500*, *Test None*. *Image-Source: Leica DCF/DVM/ICD/IC3D Camera (Firewire A/B)* program. The genus identification was performed with Barnett and Hunter (1998) and Sivanesan (1984) keys and the species was identified based on its morphology according to Smith *et al.* (2001).

## Molecular characterization and identification

In order to compare the genetic variability of the 42 studied fungi samples ISSR type DNA fingerprints were obtained. DNA was extracted from the monoconidial cultures purified in MEA with the CTAB I protocol from the recommendations of Weising *et al.* (2005). The DNA quality was confirmed in 1.2 % agarose gel in TAE 1X buffer (Tris-basis, glacial acetic acid, EDTA 0.5 M pH 8.0). The high molecular weight DNA was visualized through a *Universal Hood II (Bio-Rad)* model transiluminator and its concentration was quantified in a *NanoDrop Lambda Bio 12* model (Perkin Elmer) spectrophotometer.

## Development of ISSR Markers

The  $(AC)_8YG$ ,  $(GA)_8YC$ ,  $(GACA)_4$ ,  $(GGAT)_4$  and  $(GATA)_4$  initiators were used to describe the isolations. The PCR reactions were carried out in a 25  $\mu$ L final volume. The reaction mix included 1X Buffer,  $MgCl_2$  2.5 mM, DNA Taq polymerase 1.5 U (Promega), dNTP 200  $\mu$ M, Initiator 20 pM, DNA 100 ng and water.

## Thermocycling conditions

The samples were amplified in the *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* thermal cycler under the following program: one cycle at 95 °C, 3 min; 35 cycles [95 °C, 30 sec; 56 °C, 45 sec; 72 °C, 2 min] and final extension cycle at 72 °C for 10 min. The alignment temperature for the primers  $(GACA)_4$ ,  $(GGAT)_4$  and  $(GATA)_4$  was 48 °C. For separating the amplified fragments, a vertical chamber C.B.S. *Scientific CO*® *MVG-216-33* model with a power supply [Corporations® *E-C Apparatus*, Model *EC-105*] was used. The acrylamide gel was 6 %, and was run at 245 volts for 2.5 hours, approximately. 2  $\mu$ L of the molecular 100 bp DNA (Promega) weight marker and 3  $\mu$ L of 1 kb *O'GeneRuler*™ marker (Fermentas) were used for bands location purposes.

From the DNA profiles observed in the acrylamide gels, the percentage of mono and polymorphic bands was determined and with the data, a binary matrix was made. A dendrogram was built with the *Free-Tree* program 0.9.1.50 version and the Nei and Li/Dice coefficient by the UPGMA clustering method; the bootstrapping resampling was with 100 replicates. To display the dendrogram the *Tree View 1.6.6* program was used. Wherein the genetic distance of the samples tested was observed.



A partir de los perfiles de ADN observados en los geles de acrilamida, se determinó el porcentaje de bandas mono y polimórficas y con los datos se elaboró una matriz binaria. Se construyó un dendrograma con el programa *Free-Tree* versión 0.9.1.50 y el coeficiente *Nei and Li/Dice* mediante el método de agrupamiento UPGMA; el remuestreo *bootstrapping* fue con 100 repeticiones. Para visualizar el dendrograma se usó el programa *Tree View* 1.6.6, en el que se apreció la distancia genética de las muestras evaluadas.

## Secuenciación de la región ITS

Para la identificación molecular se utilizó un representante de los 14 aislamientos iniciales de los eucaliptos enfermos, debido a que los perfiles de las tres muestras consideradas como repeticiones fueron iguales. Se amplificó la zona ITS (espaciadores transcritos internos) con los iniciadores universales 5HP (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') y NL 4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). Las condiciones de reacción de PCR fueron: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Taq ADN polimerasa 1.5 U (Promega), dNTP 200 μM, iniciador 10 pM de c/u, ADN 100 ng y agua. El programa de termociclaje consistió de un ciclo a 95 °C por 4 min; 35 ciclos [94 °C, por 1 min; 58 °C, por 1 min; 72 °C por 2 min] y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Las ampliaciones se visualizaron en geles de agarosa 1.2 %. Las imágenes fueron documentadas con apoyo del programa *Quantity One* (Bio-Rad®).

Los productos ITS se limpiaron con EXO-SAP, previo a la secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, se editaron con los programas *FinchTV* y *BioEdit* y se alinearon con *ClustalW*. Posteriormente, fueron comparadas con algunas registradas en el *GenBank* (*outgroup*) mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El alineamiento de todas las secuencias se realizó en el programa MEGA 6.05, así como el árbol filogenético construido con el método estadístico de Máxima Parsimonia (MP), para ello se emplearon 1 000 repeticiones *Bootstrap*. Las secuencias obtenidas se subieron a la base de datos NCBI.

## Resultados y Discusión

### Caracterización fenotípica

El micelio de algunos de los aislamientos (AG-C I 55, ED-PM I 143, MAR, MI-T I 2, VC1, FR-M y AG-C) presentó color blanco de aspecto algodonoso a los cinco días, y a los 10 días se tornó gris oscuro a negro, además de aéreo y abundante; estas muestras registraron mayor velocidad de crecimiento. Las AG-C I 114, JA-S, RA-A, VC2, VC3, VC4 y VC5 fueron más lentas al colonizar las cajas Petri; el color de su micelio fue negro y estuvo adherido al medio de cultivo.

### Sequencing of the ITS region

For molecular identification, a representative of the 14 initial isolates of the seek *Eucalyptus* isolates was used because the profiles of the 3 samples considered as replications were the same. The ITS region (internal transcribed spacers) was amplified with the 5HP universal primers (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') and NL 4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). The PCR reaction conditions were: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Taq DNA polymerase 1.5 U (Promega), dNTP 200 μM, 10 pM primer each, DNA 100 ng and water. The thermocycling program consisted of one cycle at 95 °C for 4 min; 35 cycles [94 °C for 1 min; 58 °C, for 1 min; 72 °C for 2 min] and a cycle of final extension at 72 °C for 10 min. Amplifications were visualized on 1.2 % agarose gels. Images were documented with the support of the *Quantity One* (Bio-Rad) software.

ITS products were cleaned with EXO-SAP prior to sequencing. After obtaining the sequences they were edited with *BioEdit* and *FinchTV* programs and aligned with *ClustalW*. They were then compared to some reported in the *GenBank* (*outgroup*) using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alignment of all sequences was performed in 6.05 MEGA program and the phylogenetic tree constructed using the statistical method of Maximum Parsimony (MP) using 1 000 bootstrap replicates. The sequences obtained were uploaded to the NCBI database.

## Results and Discussion

### Phenotypic characterization

The mycelium of some of the isolates (AG-C I 55, I 143 ED-PM, MAR, MI-T I 2, VC1, FR-M and AG-C) showed white fluffy appearance at day 5 and at the 10<sup>th</sup>, it turned from dark grey to black, as well as airy and abundant; these samples recorded greater growth speed. The AG-C I 114, JA-S, RA-A, VC2, VC3, VC4 and VC5 samples were slower when colonizing the Petri boxes; The color of the mycelium was black and it was stuck to the culture medium.

At 25 days, in the FR-M sample dark brown to black pseudothecia were observed immersed in the EMA culture medium; and the presence of pycnidia, conidia and mature asci with ascospores (Figure 1). These morphological characteristics are consistent with those reported by Smith *et al.* (2001) to *Botryosphaeria eucalyptorum* Crous, H. J. M. Smith *et* Wingf. sp. in nov.



A los 25 días se observaron pseudotecios de color café oscuro a negro, inmersos en el medio de cultivo EMA en la muestra FR-M, así como la presencia de picnidios, conidios y ascas maduras con ascosporas (Figura 1). Características morfológicas que coinciden con los resultados de Smith *et al.* (2001) para *Botryosphaeria eucalyptorum* Crous, H. Smith *et M. J. Wingf.* sp. nov.

Another feature that has been considered for the classification of the *Botryosphaeria* genus were the teleomorphic (sexual) and anamorphic (asexual) forms. But up to date, the taxonomy of the species of this genus is mainly dependent on the anamorphic, because some of the traits used for identification as the color of the conidia, the presence of septa, or stromal morphology as they have great plasticity within the genus (Denman *et al.*, 2000).



Figura 1. A) Parte de árbol enfermo utilizada; B) *Neofusicoccum* sp. en EMA a los 25 días; C) Aspecto de ascomas; D) Corte longitudinal de picnidios; E) Picnidio y conidio; F-H) Pseudotecios; I) Asca con ocho ascosporas, observadas a 60X con el microscopio compuesto.

Figure 1. A) Part of the seek tree that was used; B) *Neofusicoccum* sp. in MEA at 25 days; C) Look of the ascomes; D) Longitudinal cut of the pycnidia; E) Pycnidium and conidium; F-H) Pseudothecia; I) Asca with eight ascospores observed at 60X with a compound microscope.



Otro carácter que se ha considerado para la clasificación de las especies del género *Botryosphaeria* es la presencia de las formas teleomórficas (sexual) y anamórficas (asexual). Sin embargo a la fecha, la taxonomía de las especies depende principalmente de los anamorfs, debido a que algunas de las características utilizadas para su identificación como el color de los conidios, la existencia de septos, o la morfología del estroma tienen gran plasticidad dentro del taxon (Denman *et al.*, 2000).

### ISSR

Todos los iniciadores utilizados fueron capaces de generar perfiles de huellas de ADN; en particular,  $(AC)_8YG$  y  $(GACA)_4$  resultaron los más informativos, porque amplificaron una cantidad de bandas superior y también mostraron mayor polimorfismo respecto al resto de los considerados; por esas razones se eligieron para hacer los agrupamientos (Figura 2). El caso contrario se verificó para  $(GA)_8YC$ ,  $(GGAT)_4$  y  $(GATA)_4$  que amplificaron pocas bandas y, por lo tanto, se decidió no incorporarlos al análisis de datos. Con los dos iniciadores seleccionados se visualizaron fragmentos de diferentes pesos moleculares, y para la contabilidad de las bandas de ADN solo se escogieron las de 300 pb hasta 1 500 pb, ya que fueron las de mejor consistencia y reproducibilidad en los geles de acrilamida. Cabe aclarar que las reacciones de PCR y los geles de acrilamida se corrieron al menos tres veces de manera independiente, sin observar variación en los resultados.

### ISSR

All the primers that were used were able to generate DNA fingerprint profiles;  $(AC)_8YG$  and  $(GACA)_4$  in particular were the most informative as they amplified a greater number of bands and showed higher polymorphism compared to the rest of the others; therefore, they were selected to make the corresponding clusters (Figure 2). The opposite condition occurred for  $(GA)_8YC$ ,  $(GGAT)_4$  and  $(GATA)_4$  which amplified a few bands, and thus, it was decided not to include them in the data analysis. With the two selected primers fragments of different molecular weight were viewed and for counting the DNA bands only those of 300 bp up to 1 500 bp were chosen, as they had the best consistency and acrylamide gel reproducibility. It is worth noting that the PCR reactions and the acrylamide gels were run at least thrice in an independent way, without observing variations in the results.

With data derived from the gels and based on the molecular weight of the fragments, a binary matrix was made, which was coded with digit 1 for present bands and 0 for absent bands. In order to establish genomic groups with ISSR electrophoretic patterns and correlate them visually with the different observed mycelia in the isolates, a radial shape dendrogram was built (Figure 3), in which, mainly, four groups are recognized: group I is represented by MAR- *Neofusicoccum* sp., VC2- *Neofusicoccum* sp. and VC1- *Diplodia corticola* A. J. L. Phillips,

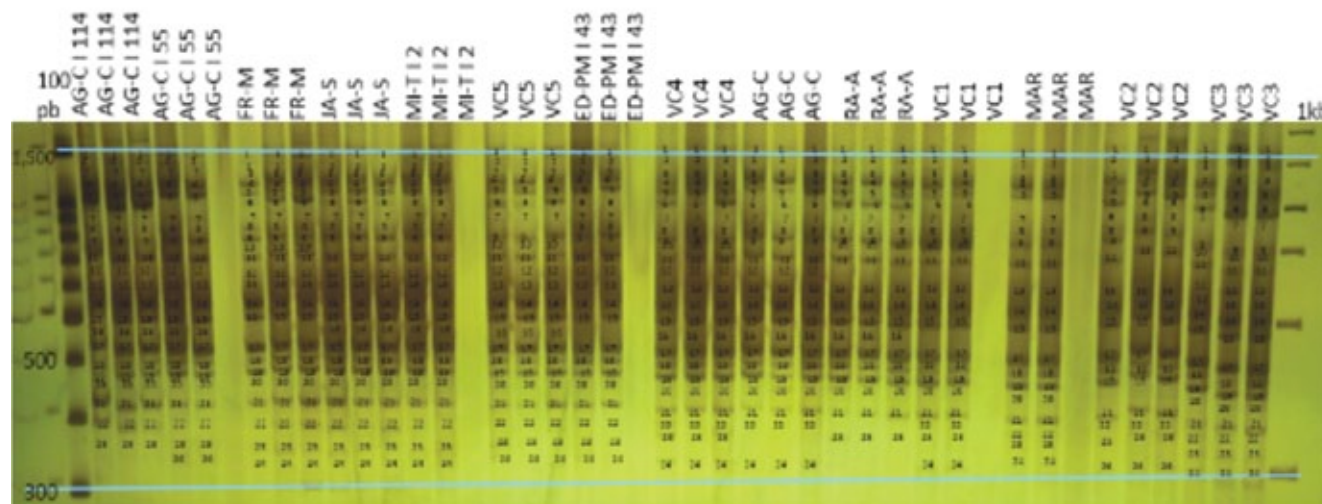


Figura 2. Huellas de ADN de aislamientos de *Botryosphaeria* obtenidas con el primer  $(GACA)_4$  separadas en gel de acrilamida 6 %. Carril 1 y 44 marcador de peso molecular de 100 pb y 1 ksb Fermentas<sup>®</sup>.

Figure 2. DNA fingerprints from *Botryosphaeria* isolates obtained with the  $(GACA)_4$  primer separated in 6 % acrylamide gel. Line 1 and 44 molecular 100 bp weight marker and 1 ksb Fermentas<sup>™</sup>.

Con los datos derivados de los geles y con base en el peso molecular de los fragmentos, se elaboró una matriz binaria en la que se codificó con el dígito 1 las bandas presentes y con 0 a las ausentes. Con el fin de establecer grupos genómicos con los patrones electroforéticos ISSR y correlacionarlos de

A. Alves & J. Luque 2004; group II, which contains VC3-*N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006, FR-M *Neofusicoccum* sp. and VC5 *Neofusicoccum* sp.; group III consisting of JA-S *Neofusicoccum* sp., AG-C I 55 *N. parvum*, AG-C I 114 *Neofusicoccum* sp., VC4-*Neofusicoccum* sp., ED-



forma visual con los diferentes micelios observados en los aislamientos, se construyó un dendrograma de forma radial (Figura 3), en el que se reconocen, principalmente, cuatro grupos: el grupo I representado por MAR- *Neofusicoccum* sp., VC2-*Neofusicoccum* sp. y VC1-*Diplodia corticola* A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque 2004; el grupo II, que contiene a VC3-*N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006, FR-M *Neofusicoccum* sp. y VC5 *Neofusicoccum* sp.; el grupo III conformado por JA-S *Neofusicoccum* sp., AG-C I 55 *N. parvum*, AG-C I 114 *Neofusicoccum* sp., VC4-*Neofusicoccum* sp., ED-PM I 43-*N. parvum*., MI-T I 2 *N. eucalyptorum* (Crous, H. Sm. ter & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006, y AG-C *N. parvum*; y el grupo IV, que incluye solamente a RA-A-*Lasiodiplodia pseudotheobromae* A. J. L. Phillips. A. Alves & Crous, 2008. Como se aprecia, el color de los micelios de los aislamientos al interior de cada grupo es variable, e incluso al interior de la misma especie puede ser diferente, como es el caso de *Neofusicoccum* sp.

PM I 43-*N. parvum*., MI-T I 2 *N. eucalyptorum* (Crous, H. Sm. ter & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006, and AG-C *N. parvum*; and group IV, which includes only RA-A-*Lasiodiplodia pseudotheobromae* A. J. L. Phillips. A. Alves & Crous 2008. As shown, the color of the mycelia isolates within each group varies, even within the same species it may be different as in the case of *Neofusicoccum* sp.

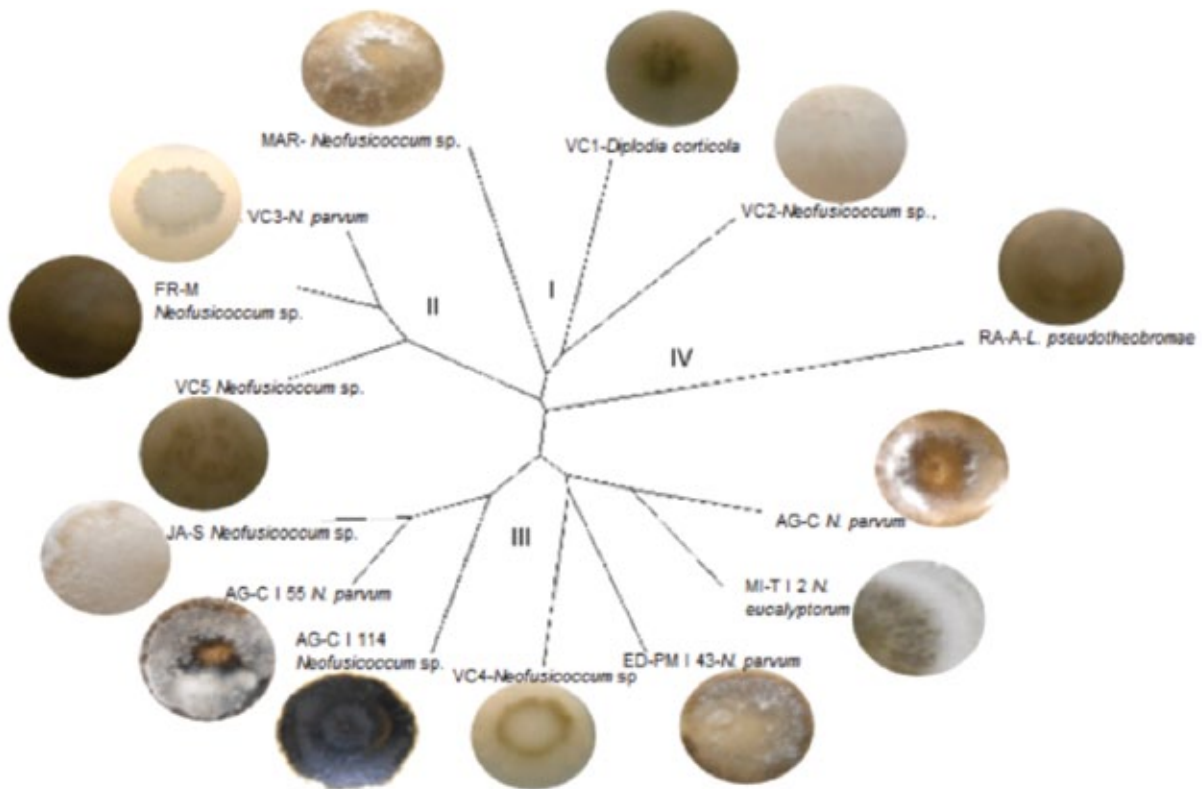


Figura 3. Dendrograma generado con perfiles ISSR obtenidos con los iniciadores  $(GACA)_4$  y  $(AC)_8YG$ , que expresa las relaciones genómicas del género *Botryosphaeria*. Se muestra la variabilidad en color y forma de crecimiento de los micelios de los diferentes aislamientos.

Figure 3. Dendrogram constructed from the ISSR profiles obtained with the  $(GACA)_4$  and  $(AC)_8YG$  primers, which exhibits the genomic relations of the *Botryosphaeria* genus. The variability in color and growth shape of the mycelia of the different isolates are shown.

Los perfiles de huellas de ADN de los distintos aislamientos revelaron alta relación genómica entre ellos. En el dendrograma respectivo no se separaron claramente las especies, quizá debido a la cantidad de fragmentos implicados en el análisis (24 totales). Sin embargo, en los tres grupos mayoritarios (I, II y III) se mezclaron diferentes especies del género. Es importante resaltar que la técnica ISSR, que se ha considerado en varias investigaciones como una opción robusta, permite estimar de forma rápida la variabilidad inter o intraespecífica de los organismos que se comparan, porque este tipo de marcadores se basa en la amplificación de fragmentos de ADN localizados entre dos regiones de microsatélites idénticos, las cuales son altamente conservadas entre las especies

### Análisis de secuencias

Los iniciadores 5HP y NL4 amplificaron fragmentos de aproximadamente 800 pb que corresponden a las regiones ITS de interés. Las secuencias se compararon con algunas secuencias cercanas reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, [HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La comparación con las accesiones de referencia mostró que la mayoría de los aislamientos pertenecían a *Neofusicoccum* sp; pero también se identificaron a *D. corticola*, *L. pseudotheobromae*, *N. eucalyptorum* y *N. parvum*. El número de accesión asignado por el NCBI a cada una de las 14 secuencias de los organismos en este estudio se indica en el Cuadro 2.

The profiles of the DNA fingerprints of the different isolates revealed a high genomic relationship between them. In the corresponding dendrogram species are not clearly divided, maybe due to the amount of fragments taken in the analysis (a total of 24). However, in the three major groups (I, II and III), as can be seen, mix several species of the genus. It is important to highlight that the ISSR technique, that has been considered in various research studies as a strong one, allows a fast estimation, of the inter and intraspecific variability of the organisms that are compared, since this kind of markers is based upon the amplification of the DNA fragments located between two regions of identical microsatellites, which are highly preserved among species.

### Sequence analysis

The 5HP and NL4 primers amplified fragments near to 800 bp that belong to the ITS regions in discussion. Sequences were compared to some others registered in the data base of the gene bank of NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) by means of the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The comparison with the reference accessions showed that most isolates belong to *Neofusicoccum* sp; but also *D. corticola*, *L. pseudotheobromae*, *N. eucalyptorum* and *N. parvum*. were identified. The accession number designated by NCBI to each of the 14 sequences of the organisms of this study are in Table 2.

Cuadro 2. Identificación de secuencias.  
Table 2. Identification of sequences.

14 Muestras	(Accesiones NCBI)	Pares bases	Regiones codificadas				% Similitud
			ITS 1	5.8s	ITS 2	28s	
<i>Neofusicoccum</i> sp.	KT454774**	1 162					
AG-C I 114	KT454770*	1 060	< 1-114	115-272	273-428	429-1008 >	99
FR-M	KT454771*	1 059	< 1-166	167-324	325-480	481-1059 >	99
JA-S	KT454772*	707	< 1-158	159-316	317-472	473 >	99
VC5	KT581966*	1 071	< 1-167	168-325	326-481	482-1071 >	99
VC4	KT581965*	1 056	< 1-163	164-321	322-477	478-1052 >	99
MAR	KT454773*	1 067	< 1-163	164-321	322-477	478-1064 >	99
VC2	KT454774*	1 059	< 1-138	139-296	297-452	453-1031 >	99
<i>Neofusicoccum parvum</i> (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006	JN135282**	704					
AG-C I 55	KT581961*	1 066	< 1-141	142-299	300-454	455-1043	99
AG-C	KT581962*	949	< 1-162	163-320	321-476	477-948 >	99
ED-PM I 43	KT581963*	1 055	< 1-163	164-321	322-477	478-1055 >	98
VC3	KT581964*	995	< 1-113	114-271	272-427	428-945 >	99
<i>Neofusicoccum eucalyptorum</i>							
(Crous, H. Sm. ter & M. J. Wingf.) Crous, Slippers & A. J. Phillips, 2006	EU860376**	754					
MI-T I 2		1 066	Completa	Completa	Completa	Parcial	99

Continúa Cuadro 2...

## Continúa Cuadro 2...

14 Muestras	(Accesiones NCBI)	Pares bases	Regiones codificadas				% Similitud
			ITS 1	5.8s	ITS 2	28s	
<i>Diplodia corticola</i> A. J. L. Phillips, A. Alves & J. Luque, 2004	KF500478**	1 074					
VCI	KT581967*	1 072	< 1-170	171-330	331-492	493-1072 >	97
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> A. J. L. Phillips, A. Alves & Crous, 2008	FN645641**	1 454					
RA-A		1 010	Completa	Completa	Completa	Parcial	99

\*Número de accesión de aislamientos del presente estudio; \*\*Accesiones del *GenBank* usadas como referencia.

\*Accession number of the present isolates in this study; \*\*Accessions of the *GenBank* used as reference.

En el estado de Michoacán se hizo la identificación morfológica y molecular de *N. parvum* y *N. eucalyptorum* (*B. eucalyptorum*) en aislamientos de *E. nitens* y *E. globulus* asociados a muerte descendente. Las secuencias genéticas de *N. eucalyptorum* (números de accesión en NCBI: KC479184 y KC4799188) y *N. parvum* (KC479185, KC479186 y KC479187) tuvieron 100 % de similitud con las correspondientes en el presente estudio, lo que es el primer registro de estas dos especies en México responsables de la enfermedad (De la Mora *et al.*, 2014). Por lo tanto, la investigación que aquí se documenta, confirma la existencia de *N. parvum* y *N. eucalyptorum* aislados de árboles de eucalipto afectados con cancro.

Por otro lado, se ha consignado la existencia de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., 1909 y *N. parvum* en frutos de mango y se les ha asociado con la muerte descendente y la pudrición del pedúnculo de ese fruto en México (Sandoval *et al.*, 2013). Dicho estudio es la primera exploración de especies de la familia *Botryosphaeriaceae* en tal cultivo. *L. theobromae*, *N. mangiferum* y *N. parvum* se asocian, regularmente, con enfermedades en las regiones productoras de mango en el mundo (Sakalidis *et al.*, 2011). *L. pseudotheobromae* fue reclasificada por Alves *et al.* (2008) como especie críptica de *L. theobromae* y la consideraron un taxón nuevo; desde entonces se ha reconocido en hospedantes con importancia comercial, como *Citrus* spp., *Coffea* sp., *Mangifera* spp. y *Rosa* sp. (Zhao *et al.*, 2010).

In Michoacán State, the morphological and molecular identification of *N. parvum* and *N. eucalyptorum* (*B. eucalyptorum*) was recorded in isolates of *E. nitens* and *E. globulus* linked to dieback. The genetic sequences of *N. eucalyptorum* (NCBI numbers of accession: KC479184 and KC4799188) and *N. parvum* (KC479185, KC479186 and KC479187) showed a similitude of 100 % with those of the actual study, which is the first report of these two species in Mexico which are responsible of the disease (De la Mora *et al.*, 2014). Therefore, the actual study confirms the existence of isolated *N. parvum* and *N. eucalyptorum* of damaged eucalyptus trees with canker.

On the other hand, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., 1909 and *N. parvum* have been found in mango fruits, and the symptom has been linked with dieback and rottenness of the pedunculus of mango in Mexico (Sandoval *et al.*, 2013). Such study is the first survey of species of the *Botryosphaeriaceae* family in this product. *L. theobromae*, *N. mangiferum* and *N. parvum* are regularly related to diseases in the producing regions of mango in the world (Sakalidis *et al.*, 2011). *L. pseudotheobromae* was reclassified by Alves *et al.* (2008) as a cryptic species of *L. theobromae* and they took it as a new species; ever since, it has been recognized in hosts with commercial value such as *Citrus* spp., *Coffea* sp., *Mangifera* spp. and *Rosa* sp. (Zhao *et al.*, 2010).



Como ya se mencionó, hay complicaciones para la correcta identificación y diferenciación entre especies de *Botryosphaeria*. Los métodos moleculares son de gran apoyo para este propósito, principalmente mediante la secuenciación de ADN y la caracterización basada en marcadores moleculares que se acercan al conocimiento de la variabilidad genómica de los organismos de interés. Pero la descripción morfológica es necesaria para complementar la identificación de dichos taxa (Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2008) y, con base en sus rasgos aparentes, se han reconocido otras nuevas. La tendencia de este incremento se debe al hallazgo y descripción de especies del género encontradas en huéspedes diferentes, respecto a otro ya estudiado (Phillips *et al.*, 2007).

Se ha cuestionado la existencia de tantas especies, y, por lo tanto, que el número pueda ser menor, sobre todo al comparar sus secuencias de ADN. Punto de vista que se basa en el hecho de que las mutaciones de nucleótidos son las responsables del enorme polimorfismo biológico que favorece la evolución; y dado que las mutaciones suceden generalmente al azar, estas podrán tener o no impacto sobre la estructura final del organismo. Sin embargo, cuando las mutaciones afectan genes codificantes de proteínas, causan polimorfismos morfológicos un ejemplo de lo anterior es la variación en la coloración y forma del micelio de *Botryosphaeria*, y quizá ese sea el principal problema que ha dado lugar a la consideración de variados taxa, aun cuando las secuencias de ADN sugieren lo contrario, como fue también el caso del presente estudio.

## Análisis filogenético

El árbol filogenético construido con las secuencias ITS relacionó a los aislamientos más parecidos con base en su similitud (Figura 4). En el filograma se observan dos grupos cuya diferencia es de alrededor de 0.03 de distancia relativa; el grupo mayor se divide en dos subgrupos: el primero de ellos contiene a VC3, VC4, VC2, FR-M, AG C 114, JA-S, VC5, MAR, ED PM I 43 y AG C que se agruparon con las accesiones JN135282 y KJ657705 que corresponden a *N. parvum* y *N. sp.*, respectivamente; el segundo subgrupo con los aislamientos AG C155 y MI T I 2 agrupados con la accesión EU860376 perteneciente a *N. eucalyptorum*; y finalmente el grupo menor conformado por los aislamientos VC1 y RA A que se agruparon con FN645641 que comprende a *L. pseudotheobromae*.

As it has been mentioned before, there are difficulties for the right identification and separation among species of *Botryosphaeria*. Molecular methods are very useful to support this ending, mainly through DNA sequencing and the characterization based on molecular markers have approached to the knowledge of the genomic variability of the organisms in question. But the morphological becomes necessary to complete the identification of such species (Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2008), and based upon their apparent traits, new ones have been recognized. The tendency of this increase comes from the finding and description of the species of the genus found in different hosts in regard to another already studied (Phillips *et al.*, 2007).

The existence of so many species has been questioned, and, hence, that the number of them could be even smaller, in particular when comparing the DNA sequences. This viewpoint is based on the fact that the mutations of nucleotides are responsible for the huge biological polymorphism that favors evolution; and, since mutations usually occur at random, they can have or not impact upon the final structure of the organism. However, when mutations affect protein coding genes, they provoke morphological polymorphisms (Bruce *et al.*, 2002); an example would be the variation in the color and shape of the mycelium of *Botryosphaeria*, and maybe it is the major problem that has originated the idea of the so different taxa, even though the DNA sequences suggest the opposite, as it happened with the actual study.

## Phylogenetic analysis

The phylogenetic tree constructed with ITS sequences linked the closest isolates based on its similarity (Figure 4). In the phylogram two groups can be observed whose difference is around 0.03 relative distance; the largest group is divided into two subgroups: the first contains VC3, VC4, VC2, FR-M, AG C 114, JA-S, VC5, MAR, ED PM I 43 and AG C which were grouped with the JN135282 and KJ657705 accessions corresponding to *N. parvum* and *N. sp.*, respectively; the second subgroup with isolations AG C155 and MI T I 2 grouped with EU860376 accession which belongs to *N. eucalyptorum*; and finally the smallest group made up of the VC1 and RA A isolates that clustered with FN645641 corresponding to *L. pseudotheobromae*.



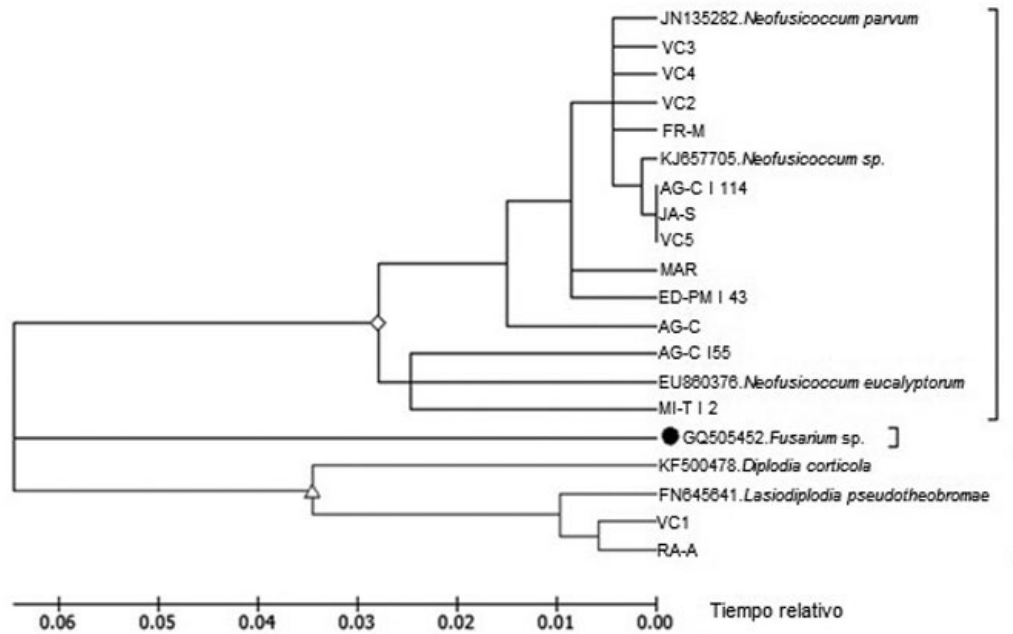


Figura 4. Árbol filogenético por Máxima Parsimonia obtenido de secuencias de la región ITS de *Neofusicoccum* sp., *D. corticola*, *L. pseudotheobromae*, *N. eucalyptorum* y *N. parvum* identificadas en el presente estudio. Las accesiones JN135282, KJ657705, EU860376, GQ505452, KF500478 y FN645641 representan a especies de referencia.

Figure 4. Phylogenetic tree by Maximum Parsimony obtained from sequences of the ITS region of *Neofusicoccum* sp., *D. corticola*, *L. pseudotheobromae*, *N. eucalyptorum* and *N. parvum* identified in this study. The JN135282, KJ657705, EU860376, GQ505452, KF500478 and FN645641 accessions are representative of the reference species.

## Conclusiones

Los aislamientos caracterizados con la técnica de ISSR del género *Botryosphaeria* mostraron poca variabilidad genómica entre sí, aun cuando estuvieron involucradas cinco especies.

Las diferencias a nivel de nucleótidos observadas en los aislamientos respecto a las especies utilizadas como *outgroups*, fueron de 1-3 %

Las especies identificadas y la incidencia de las asociadas a los canchros y secamientos de las muestras de eucaliptos enfermos que se obtuvo en las 14 muestras analizadas fueron *Neofusicoccum* sp. 50 %; *Neofusicoccum parvum* 29 %; *Neofusicoccum eucalyptorum*, 7 %; *Diplodia corticola* 7 % y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* 7 %.

## Conclusions

The isolates described by the ISSR technique and that belong to the *Botryosphaeria* genus showed little genomic variability among them, even when five species were involved.

The differences at the nucleotide level that were observed in the studied isolates in regard to the species used as *outgroups*, were 1-3 %.

The species identified and the incidence of the species associated to cankers and drying of the samples of sick *Eucalyptus* that were obtained in the 14 analyzed samples were *Neofusicoccum* sp. 50 %; *Neofusicoccum parvum* 29 %; *Neofusicoccum eucalyptorum*, 7 %; *Diplodia corticola* 7 % and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* 7 %.

## Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.



## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Contribución por autor

Dany Gabriel Santiago-Santiago: realización de colectas, desarrollo de protocolos en laboratorio y escritura del manuscrito; Ernestina Valadez Moctezuma y David Cibrián Tovar: negociación del financiamiento para la ejecución del proyecto, supervisión del trabajo en todos los aspectos y conclusión del escrito final.

## Agradecimientos

El autor principal agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, así como a la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades y el presupuesto proporcionados para realizar la presente investigación.

## Referencias

- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.
- Awasthi, A. K., G. M. Nagarajal, G. V. Naik, S. Kanginakudru, K. Thangavelu and J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5: 1-8.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA. 218 p.
- Cibrián, T., D. 2013. Manual para la identificación y manejo de plagas en plantaciones forestales. México: Universidad Autónoma Chapingo-Conafor-Conacyt. México, D.F., México. 230 p.
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2012. Programa de Desarrollo de Plantaciones Forestales Comerciales: A 15 años de su creación. <http://www.conafor.gob.mx:8080/biblioteca/ver.aspx?articulo=493> (2 de febrero de 2016).
- De la Mora C., J. G., D. Cibrián T. y O. A. Pérez V. 2014. *Neofusicoccum eucalyptorum* (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) y *N. parvum*: patógenos en plantaciones de eucalipto en México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20(3): 187-197.
- Denman, D., P. C. Crous, J. E. Taylor, K. Ji-Chuan, I. Pascoe and M. J. Wingfield. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129-140.
- Jin, Y., T. He and B. R. Lu. 2003. Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New Phytologist* 159:513-519.
- Mohali, S., B. N. Slippers and M. J. Wingfield. 2006. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela based on morphology and DNA sequence data. *Mycological Research* 110 (4):405-413.
- Pérez, C. A., M. J. Wingfield, B. Slippers, N. A. Altier and R. A. Blanchette. 2009. *Neofusicoccum eucalyptorum*, an *Eucalyptus* pathogen on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathology* 58: 964-970.
- Pérez, C. A., M. J. Wingfield, B. Slippers, N. A. Altier and R. A. Blanchette. 2010. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41: 53-69.
- Phillips, A. J. L., P. W. Crous and A. Alves. 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusata*. *Fungal Diversity* 25: 141-155.

## Contribution by author

Dany Gabriel Santiago-Santiago: collection accomplishment, laboratory protocols and writing of the manuscript; Ernestina Valadez Moctezuma and David Cibrián Tovar: funding negotiations to carry out the Project, supervision of the whole work and final version of the manuscript.

## Acknowledgements

The first author wants to express his gratitude to the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* for the grant to accomplish his Master of Science degree as well as to the *Universidad Autónoma Chapingo* for the facilities and financial support received to carry out the actual research study.

*End of the English version*



- Phillips, A. J. L., A. Alves, S. R. Pennycook, P. R. Johnston, A. Ramaley, A. Akulov and P. W. Crous. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21: 29-55.
- Sakalidis, M. L., G. E. St. J. Hardy and T. I. Burgess. 2011. Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60(320): 333-344.
- Sakalidis, M. L., J. D. Ray, V. Lanoiselet, G. E. St. J. Hardy and T. I. Burgess. 2011. Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130: 379-391.
- Sandoval, Z. M., A. D. Nieto, S. J. Sandoval I., O. D. Téliz, S. M. Orozco y V. H. Silva-Rojas. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.
- Sivanesan, A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. Lubrecht & Cramer, Ltd. Port Jervis, NY, USA. 701 p.
- Slippers, B and M. J. Wingfield. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90-06.
- Smith, H., P. W. Crous, M. J. Wingfield, T. A. Coutinho and B. D. Wingfield. 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on *Eucalyptus* in South Africa. *Mycologia* 93(2): 277-285.
- Velázquez M., A. M. Fierros G., A. Aldrete, G. A. Gómez, C. S. Fernández, H. De los Santos y H. Ramírez C. 2013. Situación actual y perspectivas de las plantaciones forestales comerciales en México. *Comisión Nacional Forestal*. Guadalajara, Jal., México. 429 p.
- Weising, K., H. Nybom, M. Pfenninger, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications. CRC press. Boca Raton, FL, USA. pp. 235-276.
- Zizumbo V., D. P. Colunga G. M., E. P. de la Cruz, P. Delgado V. and P. Gepts. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science* 45:1073-1083.
- Zhao, J. P., Q. Lu, J. Liang, C. Decock and X. Y. Zhang. 2010. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Cryptogamie Mycologie*. 31: 431-439.