

***Diplodia* sp., Causante de la Pudrición de Grano de Avena (*Avena sativa*) en Nanacamilpa, Tlaxcala, México**

***Diplodia* sp., Cause of Oat Grain Decay (*Avena sativa*) in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico**

Santos Gerardo Leyva Mir, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México–Texcoco, km. 38.5, Chapingo, Edo. de Méx., CP 56230, México; **Luis Antonio Mariscal Amaro, Héctor Eduardo Villaseñor Mir y Julio Huerta Espino**, Campo Experimental del Valle de Mexico, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km. 13.5, Carr. Los Reyes- Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Edo. Méx., CP 56250, México. Correspondencia: lsantos@correo.chapingo.mx.

(Recibido: Noviembre 25, 2010 Aceptado: Febrero 28, 2011)

Leyva Mir, S. G., Mariscal Amaro, L. A., Villaseñor Mir, H. E. y Huerta Espino, J. 2011. *Diplodia* sp., Causante de la Pudrición de Grano de Avena (*Avena sativa*) en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Revista Mexicana de Fitopatología 29:81-83.

Resumen. Para identificar el agente causal de la pudrición de grano de avena se colectaron granos infectados de la var. 'Chihuahua' en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Se realizaron los postulados de Koch y se identificó al patógeno por medio de la caracterización morfológica utilizando claves taxonómicas a nivel de género. Se observaron picnidios globosos marrón oscuro con ostiolo papilado y conidios fusiformes, bicelulares también marrón oscuro, con medidas de 17.6 a 26.4 x 4.4 a 8.8 µm. Se concluyó que el hongo corresponde al género *Diplodia* sp. No se realizó la identificación a nivel de especie por ser el primer reporte de este género en avena.

Palabras clave adicionales: Agente causal, pudrición, *Diplodia* sp.

En 2009 en México se cultivaron 935 297 ha de avena, con una producción de 10.6 millones de toneladas (SIAP, 2010). La superficie sembrada con avena ha tenido alta tasa de crecimiento en México, debido a que se le considera como cultivo alternativo en los valles altos y en el norte centro, cuando el inicio del período de lluvias se retrasa o se presentan bajas temperaturas que ponen en riesgo la siembra de los cultivos de maíz y frijol. Se ha observado una nueva enfermedad en avena cuyos síntomas característicos son amarillamientos y tizón en las hojas, junto con el desarrollo de pequeñas pústulas oscuras acompañadas de pequeñas estructuras redondas, oscuras y subepidérmicas, en hojas y granos, causando la pudrición del grano, lo que implica una pérdida importante en la producción. El objetivo de este trabajo fue identificar al agente causal de dichos síntomas, ya

Leyva Mir, S. G., Mariscal Amaro, L. A., Villaseñor Mir, H. E. and Huerta Espino, J. 2011. *Diplodia* sp., Cause of Oat Grain Decay (*Avena sativa*) in Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Revista Mexicana de Fitopatología 29:81-83.

Abstract. For to identify the causal agent of the rot of oat grain, infected grains of oat var. 'Chihuahua' were collected in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico. Were carried out the Koch's postulates and the pathogen was identified using taxonomic keys for genus. Were observed dark brown spherical pycnidia, and bicellular and fusiform conidia with a papillated ostiolo and measures of 17.6 to 26.4 x 4.4 to 8.8 µm. It was concluded that the fungus belong to genus *Diplodia* sp. The identification concerning species was not done for being the first report of this genus in oat.

Additional keywords: Causal agent, rot, *Diplodia* sp.

A total of 935 297 ha of oats were grown in Mexico in 2009, with a production of 10.6 million tons (SIAP, 2010). The oats sown has had high growth rates in Mexico because it is considered as an alternative crop in the Highlands and at the Northern Central area, when the onset of the rainy season is delayed or low temperatures are threatening both the corn and the bean planting. A new disease in oats has been observed, which symptoms are yellowing and blight, along with the development of small pustules accompanied by small round dark sub-epidermal structures in leaves and grains causing grain rot, and representing a significant production loss, thus. The present study is aimed to identify the causal agent of such symptoms; immediate control action shall be carried on once such identification had been achieved.

Oats samples of the 'Chihuahua' variety were collected in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico. A total of 20 random samples of 5 g of seed with rot symptoms were collected (Figure1b) and taken to the laboratory of

que al identificarlo se podrán tomar acciones para su control inmediato.

Se tomaron muestras de granos de avena, variedad 'Chihuahua', colectados en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. Se colectaron al azar 20 muestras de 5 g de semilla con síntomas de pudrición (Figura 1b) y se llevaron al laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los síntomas y signos observados fueron pústulas dispersas de color oscuro sobre el grano acompañadas de estructuras pequeñas, redondas, oscuras y subepidérmicas. Con una aguja flameada se hizo una siembra directa en PDA de ocho de estas estructuras por caja Petri, mismas que se revisaron cada 72 h para ver el crecimiento micelial y eliminar contaminaciones. Las cajas con buen crecimiento de micelio se usaron para realizar purificaciones en nuevas cajas con PDA mediante la técnica de punta de hifa con ayuda del microscopio estereoscópico. Con el patógeno purificado se realizó la inoculación directa al follaje de plántulas de avena (16 días de edad), var. 'Chihuahua', en invernadero, con una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} de agua destilada, la cual se licuó y se le adicionaron 4 mL de Tween 20®. Las plántulas se llevaron a invernadero con humedad relativa (HR) de 48% y temperaturas de 15 a 1 °C. Al observarse síntomas (16 días después de la inoculación) se colectaron muestras de hojas con síntomas para aislar nuevamente al patógeno. Para realizar el reaislamiento en PDA, se sembraron cortes de hojas con tejido enfermo y sano previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 5%. Las cajas con buen crecimiento micelial se utilizaron para realizar transferencias a nuevas cajas con PDA, mediante la técnica de punta de hifa, y obtener cepas puras del hongo. Con el patógeno aislado y purificado se realizó una nueva inoculación de plántulas de avena en invernadero, con la misma suspensión de conidios mencionada anteriormente. Las plántulas se llevaron al invernadero (48% HR y 15 a 18°C) y cuando se observaron síntomas se tomaron nuevamente hojas enfermas de las cuales se obtuvieron cortes de tejido sano y enfermo que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y se sembraron en PDA.

De las cepas puras del último reaislamiento se hicieron preparaciones permanentes para observar al microscopio compuesto las características morfológicas del agente causal, utilizando las claves taxonómicas para género de Sutton (1973) y Barnet y Hunter (1972). Se midió el largo y ancho de 30 conidios y se calculó la desviación estándar, varianza y el coeficiente de variación para el largo x ancho de los conidios, para obtener datos que mostraran el intervalo de variación. Esto ayudó a identificar al patógeno dentro del género apropiado

En la superficie de las hojas enfermas de campo se observaron amarillamientos y tizones junto con pústulas oscuras (Figura 1a) y primordios picnidiales, estos síntomas y signos no se han reportado anteriormente en avena. El crecimiento micelial se dio a los cinco días después de la siembra en PDA, fue de color marrón claro y se tornó oscuro conforme la cepa se avejentaba, con crecimiento homogéneo y partes blanquecinas superficiales. De acuerdo a la comparación, los síntomas observados en hojas de plantas

Agricultural Mycology of the Universidad Autónoma Chapingo. The symptoms observed were dark pustules scattered on the grain accompanied by small, round, brown sub-epidermal structures. A direct seeding with a flamed needle in PDA of eight Petri dishes was performed, which were reviewed every 72 hrs for mycelia growth and to eliminate contamination. The Petri dishes with a good mycelium growth were used for purification in new plates with PDA throughout the hyphal tip technique using the stereomicroscope. A direct inoculation to the oats seedlings foliage (16 days old), of the 'Chihuahua' variety, was carried out with the purified pathogen in a greenhouse with a suspension of 1×10^6 conidia mL^{-1} of distilled water, which was liquefied and had 4 mL of Tween 20® added to it. The seedlings were brought to a greenhouse with a 48% relative humidity (HR) and a temperature ranging from 15°C to 18°C. Leaf samples with symptoms to re-isolate the pathogen were collected as symptoms were revealed (16 days after inoculation). Leaf sections with both diseased and healthy tissue were sown in order to perform the re-isolation in PDA, previously disinfested with sodium hypochlorite at 5%. The Petri dishes with a good mycelia growth were used for transfers to new enclosures with PDA through the hyphal tip technique, looking forward to obtain pure strains of the fungus. A new oats seedlings inoculation with the isolated and purified pathogen was carried out in a greenhouse, using the same conidia suspension previously mentioned. The seedlings were transferred to the greenhouse (48% HR and 15°C at 18°C); as symptoms were observed, diseased leaves were taken once again, out of which both healthy and diseased

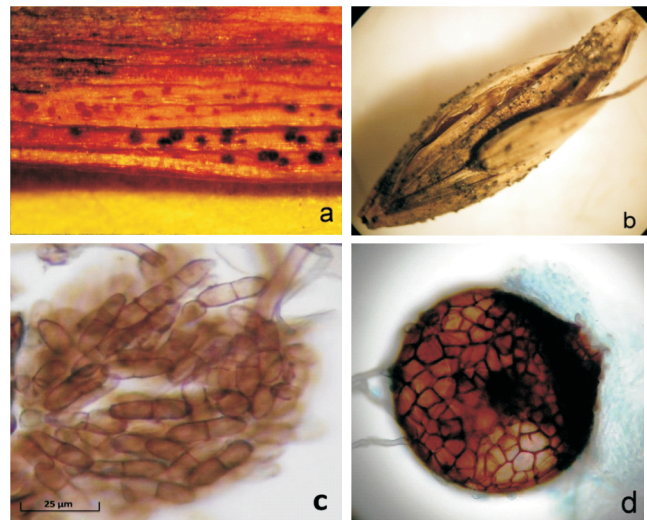


Figura 1. Síntomas y signos en hojas y granos de avena causados por el hongo del género *Diplodia* sp. Estructuras fúngicas: a) pústulas y coloración marrón en hojas; b) pústulas oscuras en la cáscara del grano; c) conidios; y d) picnidio.

Figure 1. Symptoms and signs in leaves and grains of oats caused by the fungus called *Diplodia* sp. Fungal structures: a) pustules and leaf browning; b) dark pustules on the skin of the grain; c) conidia; and d) pycnidium.

colectadas en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. El hongo reaislado presentó las mismas características morfológicas que las del hongo inoculado, correspondiendo al género *Diplodia* sp. (Sutton, 1973; Barnet y Hunter, 1972; Kendrick, 2000); y que fueron presencia de micelio septado, conidios fusiformes de color oscuro, bicelulares (21.6 µm largo x 5.6 µm ancho) (Figura 1c), que están dentro de picnidios aislados globosos marrón oscuro con ostiolo papilado (Figura 1d). Con las claves de Barnet y Hunter (1972) y Sutton (1973), comparando las características morfológicas y las medidas de los conidios, se coincidió con la descripción dada para un hongo del género *Diplodia* sp., causante de la pudrición del grano de avena en Nanacamilpa, Tlax. Las medidas de los conidios del aislamiento obtenido de las plantas inoculadas fueron 17.6 a 26.4 x 4.4 a 8.8 µm, coincidiendo nuevamente con las claves de Barnet y Hunter (1972) y Sutton (1973) para el mismo género. Según el análisis de las medidas de los conidios, la varianza para el largo (L) fue 6.43 y para el ancho (A) fue 1.90, la desviación estándar para L=2.54 y A=1.38, el C.V. para L=11.7 y A=24.4. Por lo tanto, las medidas observadas estuvieron dentro del rango que se menciona en las claves taxonómicas consultadas.

El agente causal de la pudrición de la semilla de avena en Nanacamilpa, Tlax., pertenece al género *Diplodia* sp. Los síntomas de la enfermedad fueron amarillamientos, tizones y pústulas de color marrón oscuro, aisladas, cubriendo parcialmente la superficie de la epidermis de hojas y en granos, fue evidente el estado anamorfo por presencia de las estructuras de fructificación del hongo. No se observó el estado teleomorfo del hongo en este estudio, por lo que para su identificación sólo se basó tanto en los síntomas como en las características morfológicas de los picnidios y de los conidios. Además, este hongo puede representar un peligro potencial en este cereal y por prioridad en el presente estudio, sólo se dejó la identificación a nivel de género. La identificación a nivel de especie se hará posteriormente, a través de técnicas de PCR y secuenciación. Se concluye entonces que la presencia de la enfermedad es nueva en la región de estudio y que el patógeno causante no ha sido reportado en el cultivo de avena en México.

LITERATURA CITADA

- Barnet, L.H. and Hunter, B.B. 1972. Illustrated General of Imperfect Fungi. Third Edition. American Phytopathological Society. 241p.
- Kendrick, B. 2000. The Fifth Kingdom. Third edition. Focus Publishing R. Pullins Company. USA. 374p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Cierre de la producción agrícola por estado. www.siap.gob.mx (consulta, noviembre 2010).
- Sutton, B.C. 1973. Coelomycetes. Pp:513-582. In: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. and Sussman, A.S. (eds.). The Fungi. Vol. I. VA. Academic Press, New York.

tissue was obtained, which was disinfested with sodium hypochlorite at 5% and sown in PDA.

Permanent preparations were made from the strains of the last re-isolation and had the causal agent morphological characteristics analyzed under a compound microscope, using the taxonomic keys for gender of Sutton (1973) and Barnet and Hunter (1972). The length and width of 30 conidia was measured; the standard deviation, variance and variation coefficient were calculated for conidia length and width, looking forward to obtain data which may reveal the variation range. This helped to assign the pathogen within the appropriate gender.

Yellowing leaves and tailings with dark pustules were observed on the diseased leaves (Figure 1a) and pycnidial primordium; these symptoms have not yet been reported in oats. The mycelia growth occurred 5 days after sowing in PDA; it was light brown becoming darker as the strain was aging, with a uniform growth and whitish surface spots. According to the comparison, the symptoms observed in leaves from inoculated plants were similar to those of the oat leaves collected in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico. The re-isolated fungus revealed the same morphological characteristics as those of the inoculated fungus, corresponding to the *Diplodia* sp. genus (Sutton, 1973; Barnet and Hunter, 1972; Kendrick, 2000), and were in the presence of septate mycelium, two-celled dark fusiform conidia (21.6 µm length x 5.6 µm width) (Fig. 1c), which are inside of dark brown isolated globose pycnidia with papillate ostiole (Figure 1d). After comparing the morphological characteristics and measurements of conidia with the keys of Barnet and Hunter (1972) and Sutton (1973), it coincided with the description given for a fungus *Diplodia* sp. genus, which causes the oat grain rot in Nanacamilpa, Tlaxcala. The conidia sizes of the isolate obtained from the inoculated plants were 17.6 at 26.4 x 4.4 at 8.8 µm, coinciding once again with the keys of Barnet and Hunter (1972) and Sutton (1973) for the *Diplodia* genus. According to the conidia sizes, the variance for length (L) was 6.43 and for width (W) was 1.90; the standard deviation for L=2.54 and W=1.38; the C.V. for L=11.72 and w=24.40. Consequently, the sizes observed were within the range mentioned in the consulted taxonomic keys.

The causal agent of seed rot in Nanacamilpa, Tlax., belongs to the *Diplodia* sp. genus. The disease symptoms were yellowing, tailings and dark brown isolated pustules, partially covering the epidermis surface of leaves and grains, revealing the presence of fruiting bodies of fungi. There was no fungus sexual phase in the study hereby, as only for identification based on both the symptoms and the pycnidia and conidia morphological characteristics. Additionally, this fungus may represent a potential danger in this cereal and due to publication priorities, only the identification at genus level remained. The species level identification shall be performed in further studies by PCR techniques and sequencing. Therefore, it is concluded that the presence of the disease is new in the study of the region, and that the pathogens have not been previously reported for oats.