



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática

Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

Tesis

**Análisis de poblaciones de *Fusarium* asociadas con
malformación de mango en Colima**

Que para obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

María del Carmen Quezada Gutiérrez

Asesor: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

Co-asesora: Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía

Laboratorio de Patología Vegetal

Morelia, Michoacán; agosto de 2011.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

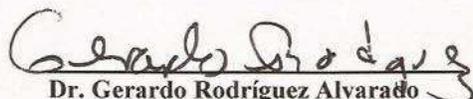
DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

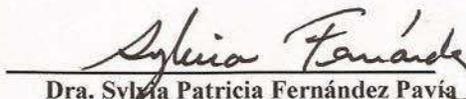
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "ANÁLISIS DE POBLACIONES DE *Fusarium* ASOCIADAS CON MALFORAMACIÓN DE MANGO EN COLIMA" presentado por la BIOL. MARÍA DEL CARMEN QUEZADA GUTIÉRREZ, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Morelia, Michoacán, a 13 de junio de 2011

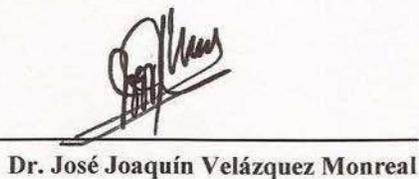
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado


Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía


Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno


Dr. Juan Carlos Montero Castro


Dr. José Joaquín Velázquez Monreal

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Programa de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proporcionarme el apoyo económico para continuar con mi formación profesional.

A los integrantes de mi Comisión Revisora, Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, Dr. Juan Carlos Montero Castro, Dr. José Joaquín Velázquez Monreal y Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno, por su apoyo para poder continuar adelante al brindarme de su conocimiento y darme esta oportunidad, por sus correcciones y valiosas aportaciones que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis.

A mi familia en especial a mis padres, Francisco Quezada y Faustina Gutiérrez quienes sin restringir esfuerzos han continuado brindándome su apoyo incondicional y confianza en mi desarrollo personal y profesional.

A América Juárez por su invaluable apoyo y consejos en cada momento de dificultad.

A mis compañeras del Laboratorio de Patología Vegetal, Marlene Díaz, Rosario Gregorio, Alina Naranjo y Núria Gómez por brindarme su amistad y compañía durante el trayecto recorrido.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Página | |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ii |
| RESUMEN..... | iii |
| SUMMARY..... | iv |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. OBJETIVOS..... | 2 |
| III. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 3.1. Descripción morfológica de hongos causantes de la malformación de mango..... | 5 |
| 3.1.1. <i>F. mangiferae</i> | 5 |
| 3.1.2. <i>F. sterilihyphosum</i> | 5 |
| 3.1.3. <i>F. mexicanum</i> | 6 |
| 3.2. Identificación de una enfermedad desconocida-postulados de Koch..... | 7 |
| 3.3. Genes utilizados en la identificación de especies de <i>Fusarium</i> | 8 |
| 3.4. Ciclo de la enfermedad malformación de mango..... | 8 |
| 3.5. Rol que tienen las hormonas vegetales en la malformación..... | 9 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 10 |
| 4.1. Medios de cultivo..... | 10 |
| 4.1.1. Medio 1X Papa Dextrosa Agar fresco (PDA)..... | 10 |
| 4.1.2. Medio ½ X Papa Dextrosa Agar fresco (PDA)..... | 10 |
| 4.1.3. Medio Papa Dextrosa Agardeshidratado(PDA)..... | 10 |
| 4.1.4. Agar agua 2% (AA)..... | 10 |
| 4.1.5. Agar Clavel (CLA)..... | 10 |
| 4.1.6. MedioSpeziellerNährstoffarmer Agar (SNA)..... | 11 |
| 4.1.7. Medio Basal..... | 11 |
| 4.1.8. Medio mínimo (MM)..... | 11 |
| 4.2. Aislamientos de <i>Fusarium</i> | 11 |
| 4.3. Descripción geográfica de los sitios de colecta..... | 12 |
| 4.4. Procesamiento de las muestras para obtener aislamientos de <i>Fusarium</i> | 13 |
| 4.5. Obtención de cultivos puros o monospóricos..... | 13 |
| 4.6. Preservación de los aislamientos monospóricos..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7. Características morfológicas en PDA..... | 14 |
| 4.8. Características morfológicas en CLA..... | 14 |
| 4.9. Pruebas de patogenicidad | 14 |
| 4.10. Extracción de ácidos nucleicos..... | 15 |
| 4.11. Amplificación de ADN por PCR para estudios filogenéticos y taxonómicos... | 15 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 18 |
| 5.1. Obtención de aislamientos de <i>Fusarium</i> | 18 |
| 5.2. Selección de aislamientos de <i>Fusarium</i> | 18 |
| 5.3. Caracterización de los aislamientos de <i>Fusarium</i> | 19 |
| 5.3.1. Características morfológicas en medio PDA..... | 19 |
| 5.3.2. Caracterización morfológica en medio CLA..... | 22 |
| 5.3.2.1. Macroconidios..... | 22 |
| 5.3.2.2. Microconidios..... | 23 |
| 5.4. Pruebas de patogenicidad..... | 26 |
| 5.5. Extracción de ADN y amplificación de los genes ef-1 α y β -tubulina..... | 29 |
| 5.6. Análisis filogenéticos..... | 30 |
| 5.6.1. Factor de elongación..... | 30 |
| 5.6.2. β -tubulina | 31 |
| 5.6.3. Calmodulina..... | 32 |
| 5.6.4. Combinación de genes factor de elongación a ef-1 α y β -tubulina..... | 32 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 35 |
| VII. LITERATURA CITADA..... | 36 |
| VIII. ANEXOS..... | 42 |
| Anexo I. Protocolo de extracción de ADN- <i>Fusarium</i> (Mahuku 2004)..... | 42 |
| Anexo II. Protocolo de extracción de ADN Wizard® Genomic DNA Purification Kit, (Promega)..... | 44 |
| Anexo III. Aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima en el año de 2007..... | 45 |
| Anexo IV. Aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima en el año de 2009..... | 48 |
| Anexo V. Posición de los cambios en las bases de secuencias del gen factor de elongación 1- α de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a tejido malformado de mango..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Anexo VI. Posición de los cambios en las bases de secuencias del gen β -tubulina de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a tejido malformado de mango..... | 54 |
|--|----|

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Características morfológicas de especies de <i>Fusarium</i> causantes de malformación de mango..... | 7 |
| 2 | Accesiones obtenidas del NCBI de especies de <i>Fusarium</i> asociadas a tejido malformado de mango..... | 17 |
| 3 | Aislamientos de <i>Fusarium</i> con falsas cabezasobtenidos de tejido malformado de mango seleccionados para la caracterización morfológica... | 19 |
| 4 | Características morfológicas de aislamientos de <i>Fusarium</i> en medio PDA..... | 21 |
| 5 | Características morfológicas de aislamientos de <i>Fusarium</i> sp. de Colima en medio CLA, con células conidiógenas mono y polifialides..... | 24 |
| 6 | Aislamientos de <i>Fusarium</i> de Colima seleccionados para pruebas de patogenicidad..... | 26 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---------------|---|
| 1 | Ubicación geográfica de los municipios de colecta de muestras de mango con malformación floral y vegetativa..... 12 |
| 2 | Aislamientos de <i>Fusarium</i> sp. en medio de cultivo PDA fresco y deshidratado..... 22 |
| 3 | Macroconidios típicos del género <i>Fusarium</i> 25 |
| 4 | Monofiálides con conidios en falsas cabezas de aislamientos de <i>Fusarium</i> en medio CLA..... 25 |
| 5 | Células conidiógenas (Polifiálides) de aislamientos de <i>Fusarium</i> en medio CLA..... 25 |
| 6 | Síntomas de malformación floral en mango variedad Haden inoculada con <i>Fusarium</i> sp. aislamiento Col-113..... 27 |
| 7 | Síntomas de malformación vegetativa ocasionados en mango variedad Haden inoculada con <i>Fusarium</i> sp. aislamiento Col-105..... 27 |
| 8 | Panícula floral de planta de mango control inoculada con agua destilada estéril..... 28 |
| 9 | Planta de mango control inoculada con agua destilada estéril..... 28 |
| 10 | Geles representativos de la extracción de ADN (A), amplificación por PCR de los fragmentos del gen factor de elongación (B) y β -tubulina (C) de aislamientos de <i>Fusarium</i> de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima..... 29 |
| 11 | Árbol parsimonioso obtenido del gen factor de elongación de taxones de <i>Fusarium</i> asociados a tejido malformado de mango..... 31 |
| 12 | Árbol parsimonioso obtenido del gen β -tubulina de taxones de <i>Fusarium</i> asociados a tejido malformado de mango..... 32 |
| 13 | Árbol parsimonioso obtenido de la combinación de los genes del factor de elongación y β -tubulina de taxones de <i>Fusarium</i> asociados a tejido malformado de mango..... 33 |

RESUMEN

La enfermedad malformación del mango es uno de los principales factores que afectan la producción de este árbol frutal en México y en la mayoría de las regiones productoras del mismo en el mundo. Se han identificado varias especies del hongo *Fusarium* como causantes de la enfermedad. Para establecer medidas eficaces de control y manejo de esta es indispensable obtener más información acerca de la identidad de las especies de *Fusarium* asociadas a dicho problema. Además, es necesario llevar a cabo estudios sobre la diversidad genética de las poblaciones de las especies de hongo asociadas, así como de la ecología y la patogenicidad de las mismas para mejorar las estrategias de control de esta enfermedad. *F. mexicanum* es un nuevo taxón que ha sido detectado en Michoacán, México. Este taxón es morfológicamente similar a *F. sterilihyphosum*, especie detectada en Sudáfrica y Brasil. La especie *F. mangiferae* ha sido detectada en las principales áreas productoras de mango en el ámbito mundial, pero no ha sido reportada en México hasta ahora. Recientemente, un nuevo linaje de *Fusarium* fue reportado como el principal agente causal de la malformación de mango en Brasil. El objetivo de esta investigación fue identificar los taxones de *Fusarium* asociados con la malformación del mango en el estado de Colima. Se colectaron muestras con malformación floral y vegetativa en los municipios de Colima, Villa de Álvarez, Manzanillo y Tecomán. Los aislamientos de *Fusarium* obtenidos fueron purificados mediante cultivos monospóricos. En base al color del micelio estos aislamientos se separaron en dos grupos distintos; uno de los grupos presentó colonias de color violeta ligero y el rango de longitud de los macroconidios varió de 27.5µm a 62.5µm, mientras que en el otro grupo éstas eran de color naranja y se reportó un rango longitud de macroconidia de 32.5µm a 62.5µm. La mayoría de los microconidios fueron ovoides, mientras que algunos fueron reniformes, presentaban un septo y estaban dispuestos en falsas cabezas en mono y polifialides.

El ADN de los aislamientos de *Fusarium* de Colima fue amplificado con oligonucleótidos específicos para regiones de los genes *ef-1α* y β -tubulina y de los fragmentos resultantes se obtuvieron sus secuencias, las cuales se utilizaron para determinar las relaciones filogenéticas entre estos y con taxones de *Fusarium* causantes de malformación en el ámbito mundial. Se realizaron análisis individuales de las secuencias con diferentes métodos como fue de distancia, probabilísticos y en combinación para máxima parsimonia. La topología de los árboles obtenidos mostrados clados con los aislamientos del estado de Colima; el clado I resultó estar emparentado con *F. mexicanum*, mientras que el clado II se encuentra cercano a los taxones de *F. sterilihyphosum*

Fusarium sp. de Brasil, sin embargo, es diferente de estos. Es conveniente obtener información de secuencias de otras regiones genómicas para confirmar la identidad de los aislamientos. Las pruebas de patogenicidad llevadas a cabo con una selección de los aislamientos de los dos clados, resultaron positivas al inducir los síntomas típicos de la enfermedad en plantas de mango.

PALABRAS CLAVE: *Mangiferae indica*, enfermedades, hongo.

SUMMARY

Mango malformation is the main disease affecting the production in Mexico and worldwide productive areas. Several taxa of *Fusarium* have been identified as the causal agents of this disease. To establish effective control measures it is indispensable to obtain more information about the identity of the species of *Fusarium* associated with the disease. In addition, it is necessary to realize studies on the genetic diversity, ecology and pathogenicity of these species, in order to improve the control measures. *F. mexicanum* is a new species that have been detected in Michoacan Mexico. It is morphologically similar to *F. sterilihyphosum* which is distributed in South Africa and Brazil. *F. mangiferae*, which has the largest geographic distribution worldwide has not been detected in México so far. Recently, a new lineage of *Fusarium* was reported as the main causal agent of mango malformation in Brazil. The focus of this research was to identify *Fusarium* isolates associated with mango malformation in Colima, México. Samples were collected with floral and vegetative mango malformation in several mango growing areas in Colima. The isolates of *Fusarium* were purified by single spore cultures. Based on cultural and morphological characterization, the isolates were placed into two groups. One group showed purple light colony color and macroconidia length range of 27.5µm to 62.5µm. A second group showed orange colony color with macroconidia length range of 32.5µm to 62.5µm. Microconidia were ovoid, while some were reniform, with one septa, and originated in mono- and polyphalides.

DNA from the isolates was amplified with specific primers to obtain sequence fragments for *ef-1α* and *β-tubulin* genes. The obtained sequences were used to determine phylogenetic relationships among the *Fusarium* isolates. Several sequence manipulation methods were used to determine genetic distance, probabilistic and combination for parsimony. The topology of trees obtained showed that the *Fusarium* isolates from Colima formed two clades: one clade shows identity with *F. mexicanum*, while the second clade is related to *F. sterilihyphosum* and *Fusarium* sp. Brazil; however it is different from these two taxa. It is necessary to obtain information from additional genomic regions to confirm the identity of the isolates. Pathogenicity test conducted with a selection isolates from both clades, induced symptoms typical of the disease in mango seedlings.

I. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cultivos frutícolas de mayor importancia a nivel mundial, México se encuentra dentro de los primeros diez productores (FAOSTAT 2009) con una superficie sembrada de 183, 892.95 ha y obteniendo una producción de 1'509, 271.96 toneladas de fruto registradas para el 2009 (SIAP 2009).

En el estado de Colima se cultiva una superficie de 4,383.51 hectáreas que producen 43,192 toneladas de fruta (SIAP 2009). Los principales municipios productores son: Manzanillo, Tecomán y Armería; siendo las principales variedades cultivadas: Manila, Tommy Atkins, Haden, Ataulfo, Kent y Keitt (Prieto *et al.* 2005).

El mango es afectado por varias enfermedades que limitan su producción en todas las fases de desarrollo del cultivo (Prieto *et al.* 2005), entre las que destacan la cenicilla polvorienta causada por *Oidiummangiferae*Berth, antracnosis (*Collectotrichumgloesporioides*Penz), mancha algal (*Cephaleurosivirescens*Kunze), mancha negra (*Alternariaalternata*Kreissler), fumagina o negrilla (*Caprodiummangiferum*), agallas (*F. decemcellulare* C. Brick) y malformación (*F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*Britz, *Fusarium* sp.y *F. mexicanum*) (Ploetz y Freeman 2009; Lima *et al.* 2009; Otero-Colina *et al.* 2010).

La enfermedad malformación del mango es considerada como el factor limitante fitosanitario más importante del cultivo en las principales áreas productoras en el mundo (Kumar y Beniwal 1992; Kumaret *al.* 1993), incluyendo México. Esta enfermedad se ha estudiado ampliamente; sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos sobre su biología y control (Kumar *et al.* 1993).

En México la malformación del mango se reportó por primera vez en el estado de Morelos (Guzmán 2004). Se encuentra presente en todas las zonas productoras del cultivo en el país. La enfermedad afecta las inflorescencias ocasionando reducción en elrendimiento del árbol infectado. Se han reportado pérdidas del 30 al 40% en producciónen los estados de Guerrero, Michoacán y Nayarit (Noriega *et al.* 1996).

Los síntomas principales de esta enfermedad son la malformación de los brotes florales (panículas) y de los brotes vegetativos. En los brotes vegetativos ocurre una pérdida de la dominancia apical, engrosamiento de las yemas vegetativas axilares o apicales y una reducción severa en el área de la lámina foliar dando lugar a hojas muy pequeñas. En las panículas afectadas se incrementa el número de flores masculinas, disminuye el número de flores hermafroditas y las pocas que son producidas son estériles o si se fertilizan abortan posteriormente. Además, se produce un número anormal de flores

que saturan los ejes hipertrofiados incrementando el peso de la panícula. Inicialmente las panículas deformes son de color verde pero posteriormente se tornan cafés al morir los tejidos (Ploetz 2003).

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar los taxones de *Fusarium* asociados con la malformación del mango en el estado de Colima y determinar su patogenicidad.

Objetivos específicos

1. Establecer la relación filogenética entre los aislamientos de *Fusarium* del estado de Colima, con *F. mexicanum* y con taxones de *Fusarium* causantes de malformación en el ámbito mundial, utilizando las secuencias del gen factor de elongación y β - tubulina.
2. Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejido malformado de mango en huertas del estado de Colima.
3. Determinar la patogenicidad de aislamientos representativos de los taxones analizados.

III. ANTECEDENTES

La etiología de la malformación de mango fue muy controversial por muchos años (Kumar y Beniwal 1992) y se han sugerido diferentes factores como agentes causales de la enfermedad entre los que destacan: deficiencias nutricionales (Prasad *et al.* 1965), desbalance hormonal (Dang y Daulta 1982; Singh y Dhillon 1989), virus (Kausar 1959), ácaros (Narasimhan 1954) y hongos (Varma *et al.* 1974). El ácaro *Aceria mangiferae* fue detectado en las yemas de mango y se sugirió una hipótesis como el causante del problema por muchos años debido al alto número de ácaros observados en los árboles con malformación. Posteriormente la teoría fúngica fue bien establecida siguiendo los postulados de Koch con varios hongos, ciertas especies del género *Fusarium* han mostrado los síntomas de la enfermedad (Summanware *et al.* 1966; Varma *et al.* 1974; Ploetz y Gregory 1993; Freeman *et al.* 1999; Britzet *et al.* 2002; Ploetz 2003; Marasas 2006; Lima *et al.* 2009 y Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008). Sin embargo, es claro ahora que *A. mangiferae* no es el agente causal de la enfermedad aunque varios estudios sugieren que el ácaro interactúa con el patógeno fúngico resultando un incremento en la severidad de la enfermedad (Gamliel-Atinsky *et al.* 2009a)

El género *Fusarium* representa uno de los grupos más perjudiciales de hongos ascomicetos. Las especies de *Fusarium* son responsables de grandes pérdidas económicas en el ámbito mundial debido a la reducción en la producción y calidad de los alimentos (Kvas 2009). El género contiene algunas de las principales especies de patógenos de plantas que afectan la agricultura y la horticultura (Summerell 2010). Recientemente las especies de *Fusarium* han emergido como patógenos de humanos causando infecciones invasivas de pacientes con inmunodeficiencia (Kvas 2009).

Desde hace más de 40 años se ha reportado evidencia de que un hongo es el agente causal de la malformación del mango. Grupos de investigadores en la India usando pruebas de patogenicidad fueron los primeros en mostrar que *Fusarium moniliforme* (nombrado posteriormente como *F. subglutinans*) causaba la malformación floral (Summanware *et al.* 1966) y la malformación vegetativa (Varma *et al.* 1974) en este cultivo. Posteriormente otros autores en Egipto (Ibrahim *et al.* 1975), EUA (Ploetz y Gregory 1993), Israel (Freeman *et al.* 1999), África del Sur (Manicom 1989) y México (Díaz Balderas y Romero Cova 1980; Noriega 1996) demostraron la asociación consistente de *Fusarium* con el tejido enfermo de mango y reprodujeron la enfermedad en pruebas de patogenicidad.

Una demostración clara de que *Fusarium* es el causante de la enfermedad se llevó a cabo utilizando aislamientos de *Fusarium* transformados con genes marcadores, pruebas de

patogenicidad en plántulas de mango y estudios histológicos de los tejidos afectados (Freeman *et al.* 1999). Aislamientos de *F. subglutinans* obtenidos de panículas malformadas de mango, se transformaron con el gen marcador GUS (β -glucuronidasa) y el gen para resistencia al antibiótico higromicina. Cinco transformantes estables que expresaban ambos genes se inocularon por separado en plántulas de mango. Los cinco transformantes de *F. subglutinans*, al igual que el aislamiento original de *F. subglutinans* sin transformar, causaron los síntomas de la malformación en tejidos floral y vegetativo, de seis a ocho semanas después de la inoculación. El micelio teñido con GUS fue observado dentro de los órganos infectados de las plantas de mango (Freeman *et al.* 1999).

El nombre de *F. subglutinans* se ha utilizado para referirse a un grupo de hongos que producen estructuras reproductivas asexuales muy similares, pero que causan enfermedades en diferentes cultivos, tales como maíz, mango, pinos y piña. Algunos de estos hongos son capaces de producir estructuras reproductivas sexuales en ensayos de apareamiento, por lo que se les ha colocado taxonómicamente como parte de un complejo de especies dentro del género *Gibberellafujikuroi* (Leslie 1995; Britzet *al.* 1999; O'Donnell *et al.* 1998, 2000; Steenkamp *et al.* 1999, 2000). En la fase asexual estas especies son difíciles de distinguir usando caracteres morfológicos (Leslie y Summerell 2006), pero pueden ser reconocidos usando pruebas de apareamiento y de patogenicidad (Leslie 1995). Recientemente, para distinguir rápidamente los diferentes linajes de *F. subglutinans* se han utilizado técnicas moleculares para comparar las secuencias de los genes de β -tubulina (O'Donnell *et al.* 1998; Steenkamp *et al.* 2000), histona H3 (Steenkamp *et al.* 1999, 2000), factor de elongación 1 α de la traslación y el decalmodulina (O'Donnell *et al.* 2000).

En estudios comparativos de las secuencias de los genes nucleares de aislamientos de *Fusarium* de tejidos malformados, Britzet *al.* (2002) encontraron que estos aislamientos pueden agruparse taxonómicamente en dos grupos: en un grupo se encuentran aislamientos de *F. subglutinans* obtenidos en Egipto, Florida (EUA), Israel, Malasia y Sudáfrica (Britzet *al.* 2002), y para el cual los autores propusieron el nombre de *F. mangiferae*. El segundo grupo incluye aislamientos obtenidos de plantas malformadas en Sudáfrica (Britzet *al.* 2002) y en Brasil (Zheng y Ploetz 2002), y sugirieron la especie *F. sterilihyphosum* para dicho taxón.

En Michoacán, México, se detectó un taxón de *Fusarium* patogénico en mango, el cual presenta características morfológicas similares pero es filogenéticamente diferente a

F. sterilihyphosum (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008). Recientemente, esta nueva especie ha sido formalmente descrita como *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010).

Así mismo, un nuevo linaje de *Fusarium* fue reportado como el principal agente causal de la malformación de mango en Brasil. Este nuevo taxón es morfológicamente similar a *F. sterilihyphosum*; sin embargo, filogenéticamente es diferente a todos los taxones reportados como causantes de la malformación del mango y se ha denominado informalmente como *F. 'subglutinans'* (Lima *et al.* 2009).

3.1. Descripción morfológica de hongos causantes de la malformación de mango

3.1.1. *F. mangiferae*

La tasa de crecimiento de las colonias de *F. mangiferae* en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) es de 3.4 mm/día a 25° C, el micelio es aéreo, blanco, flocoso, el reverso de las colonias es algunas veces rosado a púrpura oscuro, presentan conidióforos en el micelio aéreo, erectos o postrados en el medio. Los conidióforos son simpodialmente ramificados originando mono y polifialides. Las polifialides tienen de 2 a 5 aberturas conidiógenas. Hifas estériles ausentes. Los microconidios son variables en forma, aunque la forma ovoide es la más abundante y ocasionalmente la oval o alantoide. El microconidio es unicelular de 4.3–14.4 µm de largo (promedio 9.0 µm) x 1.7–3.3 µm de ancho (promedio 2.4 µm). Los macroconidios son largos y delgados, usualmente tienen de 3 a 5 septos, de 43.1–61.4 µm de largo (promedio 51.8 µm) x 1.9–3.4 µm de ancho (promedio 2.3 µm). Clamidosporas ausentes (Cuadro 1) (Britzet *et al.* 2002).

3.1.2. *F. sterilihyphosum*

Las colonias de *F. sterilihyphosum* en PDA presentan una tasa de crecimiento de 4.8 mm/día a 25° C. El micelio aéreo es casi blanco. El reverso de las colonias es de color pajizo a rosa grisáceo o púrpura claro. Los conidióforos son simpodialmente ramificados y tienen mono y polifialides. Los microconidios son usualmente ovales, unicelulares, de 4.5–14.2 µm de largo (promedio 8.8 µm) x 1.6–3.5 µm de ancho (promedio 2.6 µm). El macroconidio tiene una célula apical algo picuda, una célula basal como pie, y presentan usualmente de 4 - 6 células de 28.4–47.1 µm de largo (promedio 37.1 µm) x 2.4–4.1 µm de ancho (promedio 3.2 µm). Forma hifas estériles enrolladas. Clamidosporas ausentes (Cuadro 1) (Britzet *et al.* 2002).

3.1.3. *F. mexicanum*

En PDA el micelio aéreo de *F. mexicanum* se presenta suelto a densamente floculado, blanco o con tonos de rosa, violeta o gris. La pigmentación en el reverso de la caja es amarilla claro, anaranjado claro, lila, lila grisáceo, algunas veces parcialmente púrpura oscuro a violeta oscuro en el centro. Clamidosporas y esclerocios ausentes. Olor ausente. La esporulación en SNA empieza en el micelio aéreo y después en los esporodoquios. Los esporodoquios son producidos en todas las condiciones de luz sobre o dentro del agar. Las hifas enrolladas generalmente son formadas abundantemente, pero pueden estar ausentes en algunos aislamientos. Son multiseptadas, de 2 a 2.5 μm de ancho, ramificadas o no ramificadas, y la mayoría son estériles, raramente formando monofialides en la punta o en los lados de las ramificaciones. Los conidióforos aéreos son generalmente erectos, algunos postrados, simples sin ramificaciones, o con pocas ramificaciones simpodialmente o verticiliados, terminando en fialides. Las células conidiógenas en los conidióforos aéreos son monofialídicas o polifialídicas; los conidios que surgen en el micelio aéreo en oscuridad están dispuestos en cabezas falsas como masas amorfas. Los conidios aéreos se presentan sin septos o con dos septos, son cortos clavados a elipsoidales, la mayoría rectos, algunas veces curvos, o de reniformes a forma de C. Los conidios desarrollados en oscuridad y rectos tienen un rango de 4-18.5 x 1-3.5 μm y promedios de 6.9-9.8 x 2.3-2.7 μm ; los conidios en forma de C sin septos, desarrollados en oscuridad presentan un rango de 6.5-27.5 x 1.5-5.5 μm y un promedio de 9.8-13.0 x 2.3-2.7 μm . Los conidios fusiformes, rectos o curvos, con 1-3 septos sin célula de pie en ocasiones son formados en conidióforos aéreos; conidios con 3 septos presentan un rango de 25-37 x 3-5 μm y un promedio de 28.7-31.0 x 3.7-3.8 μm . Los conidios formados en esporodoquios presentan 1, 3 ó 5 septos, son falcados y curvos dorsiventralmente, a menudo más anchos en la región central de su longitud, estrechándose hacia ambos extremos, con una célula apical acuminada formando un pico estrecho y una célula basal distintiva con forma de pie, la mayoría son formados en esporodoquios, sobre o dentro del agar; conidios con 3 septos formados en oscuridad presentan un rango de 21.5-62 x 1.5-5 μm y un promedio de 30.9-43.4 x 2.7-3.8 μm (Cuadro 1) (Otero-Colina *et al.* 2010).

Cuadro 1. Características morfológicas de especies de *Fusarium* causantes de malformación de mango.

| Especie | Longitud de macroconidias µm | Presencia de hifas enrolladas | Presencia de clamidosporas |
|--|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>F. mangiferae</i> ^a | 43-61 | - | - |
| <i>F. sterilihyphosum</i> ^b | 28-47 | + | - |
| <i>F. mexicanum</i> ^c | 21.5-62 | + | - |

aBritzet *al.* 2002; Marasaset *al.* 2006.

bBritzet *al.* 2002; Zheng y Ploetz 2002 y Marasaset *al.* 2006.

c Otero-Colina *et al.* 2010.

3.2. Identificación de una enfermedad desconocida-postulados de Koch

Cuando un patógeno se encuentra en una planta enferma, puede ser fácilmente identificado utilizando manuales especializados; en caso de que se tenga la certeza de que el patógeno es la causa de la enfermedad, podrá considerarse entonces que ha concluido el diagnóstico. Sin embargo, en caso de que sea probable que el patógeno represente la causa de la enfermedad, pero que no existan registros anteriores que apoyen esa suposición, tendrán que considerarse los siguientes puntos para comprobar la hipótesis de que el patógeno es la causa de esa enfermedad:

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito no obligado), o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

En caso de que los puntos mencionados (comúnmente conocidos como postulados de Koch) se cumplan, se tendrá la certeza de que el patógeno aislado es la causa de la enfermedad (Agrios 2005).

3.3. Genes utilizados en la identificación de especies de *Fusarium*

1) Factor de elongación de la traslación (ef-1 α)

Los ribosomas son el sitio de síntesis de proteínas y requieren de la actividad de varios factores para su correcta función como son iniciación, elongación y terminación (Moreira *et al.* 2002). El gen ef-1 α , el cual codifica una parte esencial del mecanismo de la traslación de las proteínas, tiene alta utilidad filogenética por ser altamente informativo a nivel especie del género *Fusarium*. Además, muestra un alto nivel de polimorfismos en las secuencia entre especies estrechamente relacionadas en comparación con otros genes (Geiser *et al.* 2004).

2) β -tubulina

La tubulina es el principal componente estructural de los microtúbulos, está organizada en α y β heterodímeros, ambos son altamente conservados entre especies (Jostet *al.* 2004); el gen β -tubulina es rápidamente amplificado y secuenciado en algunos hongos (Peterson 2006); la secuencia de este gen provee una excelente herramienta para estudiar relaciones filogenéticas en todos los niveles taxonómicos. Este gen ha sido usado exitosamente para determinar relaciones intra e interespecíficas en *Fusarium* (Steenkamp 2000).

3.4. Ciclo de la enfermedad malformación de mango

En un ciclo propuesto la enfermedad malformación del mango causada por *F. mangiferae* (Gamliel-Atinsky *et al.* 2009b, 2009c) menciona que el tejido malformado floral y vegetativo sirve como la principal fuente de inóculo. El inóculo se disemina pasivamente en el aire como conidios o como restos de las inflorescencias malformadas del ciclo anterior. Muchos de los conidios caen sobre el dosel del mango y llegan hasta los sitios de infección por diferentes rutas: 1) caen directamente sobre las panículas florales, 2) existen vectores que facilitan la dispersión como el ácaro *Aceria mangiferae*, o 3) vía conidios en restos que caen sobre los brotes apicales. La germinación de conidios y la infección de panículas apicales pueden ocurrir en condiciones de temperaturas de 5 a 41° C, con un mínimo de 2 h de humedad. Las temperaturas moderadas de 15 a 30° C y los periodos prolongados de humedad mayores a 3 h pueden acelerar la infección. Sin embargo, la temperatura óptima para el crecimiento y germinación varía entre las diferentes especies de *Fusarium*. La presencia de *A. mangiferae* en los brotes facilita la penetración incrementando la frecuencia de infección. Después de la penetración el

patógeno coloniza el tejido del brote pero no progresa más allá de este punto. Alternativamente, cuando el tejido joven emerge de un brote apical infectado, el patógeno puede colonizar el brote apical o lateral del tejido, después de haber permanecido localizado y en brotes en dormancia hasta que estos emergen.

3.5. Rol que tienen las hormonas vegetales en la malformación

Los síntomas que presentan los tejidos malformados de mango sugieren que podría ocurrir un desbalance hormonal en dichos tejidos (PloetzyFreeman 2009). Diversos investigadores han analizado los niveles de algunas hormonas en los tejidos malformados de mango. Los niveles de ácido indol acético (IAA) y ácido giberélico (GA3) fueron diez y cinco veces más bajos en plantas malformadas que en plantas sanas, respectivamente; mientras que los niveles de zeatina fueron cinco veces más altos que los controles (Singh yDhillon 1989). En una serie de estudios, van Staden y colaboradores (Nicholsony van Staden 1988; van StadenyNicholson 1989; van Staden *et al.* 1989) analizaron las diferencias en citoquininas en plantas de mango infectadas con *F. moniliforme* (probablemente *F. mangiferae*; PloetzyFreeman 2009). Los resultados indicaron que las citoquininas diferían en cantidad y calidad en plantas sanas y plantas enfermas con malformación y al parecer el patógeno producía algunos de los metabolitos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los autores de los estudios no pudieron precisar con exactitud si la producción de hormonas por el patógeno causaba los síntomas o si la presencia del patógeno en los tejidos alteraba la producción de hormonas por la planta causando los síntomas de malformación (Ploetzy Freeman 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados en volúmenes de 250 ml de la siguiente manera; los ingredientes de los medios se pesaron y colocaron en frascos de 500 ml, agregándose 250 ml de agua destilada para disolverlos en un horno de microondas antes de ser esterilizados en una autoclave a 121° C y 15 libras (lb) de presión por 20 min. Al finalizar la esterilización se colocaron en un baño María a 49° C hasta estabilizar el medio. Posteriormente, cada medio fue vaciado en cajas Petri 100 x 15 mm o 60 x 15 mm, en una cámara de flujo laminar estéril. Las cajas Petri con medio fueron almacenadas en bolsas de plástico cerradas a 25° C hasta su uso.

4.1.1. Medio 1X Papa Dextrosa Agar fresco (PDA): Se pesaron 62.5 g de rebanadas de papa de 0.5 cm de espesor, fueron colocadas en un recipiente con 250 ml de agua destilada y se hirvieron a fuego lento hasta su cocción. Posteriormente, la infusión obtenida fue filtrada con 2 capas de gasa y se aforó con agua destilada hasta obtener un volumen de 250 ml, ésta fue vaciada en un frasco de 500 ml, se agregaron 2.5 g de dextrosa y 4.5 g de agar.

4.1.2. Medio ½ X Papa Dextrosa Agar fresco(PDA): Para preparar este medio se utilizó la misma metodología que en la sección anterior, pero utilizando 31.25 g de rebanadas de papas frescas, 1.25 g de dextrosa y 4.5 g de agar.

4.1.3. Medio Papa Dextrosa Agardeshidratado(PDA)(BD Bioxon): Se pesaron 9.75 g del medio de cultivo y se colocaron en un frasco de 500 ml y agregando 250 ml de agua destilada.

4.1.4. Agar agua 2%(AA). Para la preparación de este medio se utilizaron 5 g de agar por 250 ml de agua destilada.

4.1.5. Agar Clavel(CLA). Se vació medio estéril de agar agua al 2% en cajas de Petri 60 x 15 mm que contenían 5 trozos de aproximadamente 5 mm² de hojas de clavel esterilizadas con radiación gamma. Las hojas de clavel fueron proporcionadas por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP, Celaya, Guanajuato).

4.1.6. MedioSpeziellerNährstoffarmer Agar (SNA).Para preparar este medio se utilizaron los siguientes compuestos: 0.250 g de fosfato de potasio (KH_2PO_4), 0.250 g de nitrato de potasio (KNO_3), 0.125 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.125 g de cloruro de potasio (KCl), 0.05 g de glucosa, 0.05 g de sacarosa, y 5 g de agar. Después de que el medio se gelificó en las cajas de Petri de 60 x 15 mm, posteriormente 2 trozos de papel filtro Whatman estéril de 1cm² fueron colocados en el centro de la caja sobre el medio.

4.1.7. Medio Basal (Correllet *al.* 1987): Para preparar 250 ml se agregó lo siguiente 0.5 g de fosfato de potasio (KH_2PO_4), 0.125 g de sulfato de magnesio($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.125 g de cloruro de potasio (KCl)y 0.05 ml de solución de elementos, se aforó a 250 ml con agua destilada. La solución de elementos contiene en 100 ml los siguientes compuestos: 5 g de ácido cítrico, 0.5 g de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1 g de sulfato férrico [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], 250 mg de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 50 mg de sulfato de manganeso (MnSO_4), 50 mg de ácido bórico (H_3BO_3), 50 mg de molibdato de sodio($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

4.1.8. Medio mínimo(MM) (Correllet *al.* 1987): Para preparar este medio se agregó 0.5 g de nitrato de sodio (NaNO_3), 7.5 g de sacarosa y se aforó a 250 ml con medio basal.

4.2. Aislamientos de *Fusarium*

Los aislamientos de *Fusarium* utilizados en este estudio fueron obtenidos a partir de tejidos floral y vegetativo de mango con síntomas de malformación en huertas localizadas en los Municipios de Manzanillo y Tecomán y de la zona urbana de la ciudad de Colima y Villa de Álvarez, del estado de Colima obtenidos en los años 2007 y 2009, ambas colectas se realizaron con el propósito de obtener un mayor número de aislamientos de las principales zonas productoras de mango en el estado (muestras colectadas por el Dr. J. J. Velázquez-Monreal, INIFAP Colima) (Fig. 1).

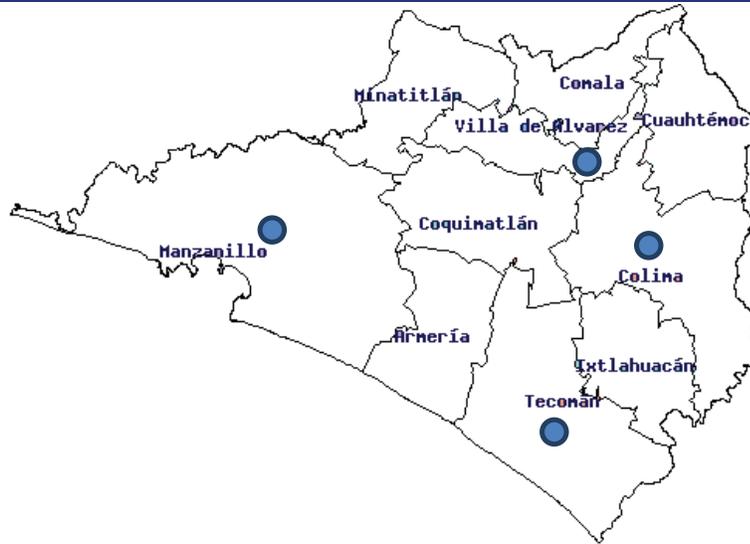


Figura 1. Ubicación geográfica de los municipios de colecta de muestras de mango con malformación floral y vegetativa.

4.3. Descripción geográfica de los sitios de colecta

a) **Colima:** El municipio tiene una altitud promedio de 550 metros sobre el nivel del mar (msnm) y una mínima de 305 metros, presenta una extensión territorial de 668.2 km². El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano en la mayor parte del municipio; la temperatura media anual es de 24 a 26° C y con lluvia anual de 800 a 1,000 milímetros cúbicos (mm³).

b) **Manzanillo:** Esta localizado al oeste del estado de Colima, por su extensión es el municipio más grande del estado con altitud de 4 msnm en el malecón; el clima del municipio es subhúmedo, cálido, con temperatura media entre 26 y 28° C la más alta y de 22 a 23° C la más baja. Durante el verano llegan a registrarse temperaturas muy elevadas de 30 a 34° C. El registro pluvial medio anual es entre 800 y 1,200mm³.

c) **Tecomán** El municipio ocupa una extensión territorial de 834.77 km² que corresponden al 15 por ciento de la superficie estatal. Está situado a 33 msnm. En el municipio predominan los climas semiseco muy cálido, cálido al norte y centro del municipio; al sur, cálido subhúmedo. La temperatura media anual es de 26° C, con una precipitación media anual de 484.9 mm³ siendo el régimen de lluvias, principalmente en verano.

d) **Villa de Álvarez:** El Municipio se encuentra a una altitud máxima de 1,600 msnm y una mínima de 440 msnm, limita al norte con el Municipio de Comala; al suroeste con el de Colima. Los climas del municipio por su grado de humedad son subhúmedos; al centro

y norte del municipio existe un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y al noroeste presenta, también el cálido subhúmedo y semicálido subhúmedo, también con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 23.7° C y la precipitación pluvial media de 1,193.8 mm³ (INAFED 2005).

4.4. Procesamiento de las muestras para obtener aislamientos de *Fusarium*

Las muestras fueron colocadas en una charola con agua y detergente durante 10 minutos para eliminar posibles contaminantes como ácaros, insectos y polvo. Se enjuagaron con agua de la llave para remover el detergente. Posteriormente, se cortaron 9 explantos de 0.2mm de longitud de cada muestra, los cuales se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de cloro (Cloralex®) al 10% con un poco de detergente durante 2 minutos. Los explantos enjuagados dos veces con agua destilada estéril se secaron con papel estéril. Utilizando pinzas estériles con alcohol y flama se colocaron en cajas Petri con medio ½X PDA incubándolos a 25° C por 24 a 48 horas. Posteriormente, se transfirió un bloque de medio de 0.5 mm³ con puntas de hifas del micelio que surgió de cada explanto a medio SNA para inducir esporulación.

4.5. Obtención de cultivos puros o monospóricos

Para obtener un cultivo monospórico de cada aislamiento se utilizaron los aislamientos en crecimiento activo en medio SNA. Se tomó un bloque de medio, micelio y conidios de aproximadamente 4 mm³, para colocarlo en el interior de un tubo de vidrio con 5 ml de agua destilada estéril, el tubo fue agitado para obtener una suspensión de conidios, se tomaron 30 µl de la suspensión con una micropipeta y se colocaron sobre la superficie de medio AA 2% en el centro de cajas Petri 100 x 15 mm. A continuación, la suspensión de conidios fue dispersada sobre la superficie del medio con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 25° C en oscuridad por 20 horas para inducir la germinación de los conidios. Después de la incubación las cajas fueron observadas con un estereoscopio para ubicar conidios germinados, los cuales se transfirieron cortando un bloque de medio de 1 mm³ aproximadamente conteniendo un conidio germinado a cajas con medio SNA. Las cajas con SNA se incubaron bajo luz blanca y negra a 25° C, por un periodo de 15 días para favorecer una esporulación abundante.

4.6. Preservación de los aislamientos monospóricos

Para preservar cada aislamiento se utilizaron los crecimientos monospóricos activos en medio SNA. A la caja de cada aislamiento se agregó 3 ml de glicerol al 15% estéril sobre el crecimiento micelio. La solución de glicerol se pipeteó varias veces sobre el micelio para facilitar el desprendimiento de los conidios del micelio. La suspensión de conidios de cada aislamiento se transfirió a dos viales criogénicos de 2 ml, los cuales fueron almacenados a -70° C en la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH.

4.7. Características morfológicas en PDA

Se utilizaron cajas Petri 60 x 15 mm preparadas con 7 días de anticipación. Las cajas se inocularon depositando en el centro de las mismas una gota de 20 μ l de la suspensión de conidios. Una vez que la suspensión de conidios se había absorbido al medio, las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25/ 20 $^{\circ}$ C con un fotoperiodo de 12 horas, esto se realizó con el objetivo de determinar el tipo y color de micelio y de hacer una comparación de la pigmentación de los aislamientos seleccionados en los dos medios utilizados PDA fresco y PDA deshidratado. Las observaciones y la toma de los datos fueron registradas 15 días después de la inoculación.

4.8. Características morfológicas en CLA

Se utilizaron cajas Petri 60 x 15 mm con medio CLA, las cajas se inocularon depositando en el centro de las mismas una gota de 20 μ l de la suspensión de conidios. Una vez que la suspensión de conidios fue absorbida por el medio de cultivo, las cajas se sellaron con Parafilm e incubadas de igual forma que en la sección anterior. Las observaciones se llevaron a cabo 10 días después de la inoculación. Se hicieron preparaciones para el microscopio compuesto tomando muestras de medio más micelio, conidios y de trozos de clavel, realizando las siguientes observaciones de 25 conidios de cada tipo: se determinó el número de septos, la longitud y el ancho para macroconidios y forma, el tipo de fiálide, la longitud y el ancho para microconidios; además de registrar la presencia de esporodoquios, clamidosporas e hifas enrolladas.

4.9. Pruebas de patogenicidad

Se seleccionaron cinco aislamientos representando cada uno de dos grupos filogenéticamente distintos de aislamientos de *Fusarium* de Colima obtenidos de

muestras con malformación floral y vegetativa durante los años 2007 y 2009 (Quezada Gutiérrez 2008). Los postulados de Koch (véase en antecedentes) se realizaron utilizando de 2 a 3 plantas de mango de variedad Haden y criollo de dos años de edad. Las plantas para el tratamiento control fueron inoculadas únicamente con agua destilada estéril.

Para el crecimiento y esporulación de los aislamientos seleccionados se colocaron 20 µl de suspensión de conidios en cajas Petri con medio CLA y SNA y se incubaron en un cuarto de cultivo con temperatura controlada a 25° C y con lámparas de luz blanca y luz negra para inducir esporulación abundante. Después de diez días de incubación 1 ml de agua destilada estéril fue colocada sobre el micelio para desprender los conidios y cuantificar la cantidad de inóculo utilizando un hematocitómetro. Tratando de obtener una concentración final de 5×10^7 conidios por ml para cada aislamiento.

Para la inoculación de plantas se procedió a realizar punciones con una aguja fina estéril en yemas axilares (no terminales) en dormancia. En seguida, se colocó una gota de 20 µl con la suspensión de conidios sobre la zona herida. El área inoculada se cubrió con Parafilm durante cuatro días. Las plantas se mantuvieron en observación por un periodo de dos a cuatro meses (Freeman *et al.* 1999).

4.10. Extracción de ácidos nucleicos

Los aislamientos se crecieron de dos a siete días en medio mínimo sin agar (Leslie y Summerell 2006) a 25° C, para obtener abundante crecimiento micelial. El micelio producido se colectó en un embudo con tela Miracloth (Calbiochem) estéril y se lavó con 200 ml de agua destilada estéril. El micelio fue deshidratado colocándolo en papel aluminio a 4° C por 24 horas y posteriormente molido hasta obtener polvo fino con nitrógeno líquido, el cual se almacenó a -20° C hasta la extracción.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo del micelio molido de acuerdo al protocolo descrito por Mahuku (2004) (Anexo I) y mediante un kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) (Anexo II), para comparar la calidad de las secuencias obtenidas entre ambas extracciones de ADN.

4.11. Amplificación de ADN por PCR para estudios filogenéticos y taxonómicos

Para amplificar el factor de elongación ($ef-1\alpha$) se utilizaron los oligonucleótidos EF-1 y EF-2 (O'Donnell *et al.* 1998), los cuales hibridizan dentro de los exones conservados del factor de elongación para amplificar porciones de la región codificadora e incluyendo intrones. Para amplificar el gen de β -tubulina se utilizaron los pares de

oligonucleótidos T1 y T22, los cuales amplifican 1254 pares de bases (O'Donnell y Cigelnik 1997). Se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94° C, una temperatura de hibridización de 55° C y una temperatura de elongación de 72° C, por 35 ciclos, en un termociclador (Eppendorf). Las muestras de las amplificaciones fueron analizadas electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% TAE a 50 volts por 90 minutos. Los fragmentos amplificados se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit- Quiagen). El ADN purificado fue enviado a Macrogen Inc. para la secuenciación de cada una de las cadenas complementarias para cada región del ADN amplificado.

Se obtuvieron cadenas consenso de las secuencias obtenidas del gen α y β -tubulina para los aislamientos referidos mediante el programa Sequencher 4.8. Se utilizaron secuencias de taxones de *Fusarium* de diferentes sitios asociados con malformación de mango obtenidas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (los códigos de acceso se muestran en el Cuadro 2) para compararlos con las secuencias de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de Colima. Tres cepas de *Fusarium* sp. de Brasil (Lima *et al.* 2009), tres cepas de *F. mexicanum* (Otero-Colina *et al.* 2010), dos cepas de *F. sterilihyphosum* una de Brasil y un taxón de Sudáfrica (Lima *et al.* 2009), un taxón de *F. mangiferae* (O'Donnell 2000) y *F. oxysporum*, el cual fue utilizado para enraizar los árboles obtenidos en los análisis de secuencias de *Fusarium* de Colima así como del GenBank (O'Donnell 2000). Las secuencias fueron alineadas mediante el programa BioEdit 7.0.5 con los parámetros predeterminados, obteniéndose las distancias genéticas. Con estas matrices de datos se realizó por separado un análisis filogenético para cada gen, así como uniendo la información de ambas regiones en una matriz. La mayoría de los análisis se realizaron con el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), sólo el análisis de distancia se realizó con el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007).

En el análisis de distancia se utilizó el modelo de Jukes-Cantor. En el análisis de máxima parsimonia se realizó una búsqueda heurística con 10,000 réplicas al azar con TBR (Treebisection and reconnection, por sus siglas en inglés). Se realizó un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas en una búsqueda heurística para determinar el soporte estadístico de los clados. Para los análisis probabilísticos se determinó el mejor modelo de evolución que se ajustara a los datos con el programa ModelTest 3.7 (Posada y Crandall 1998). Con el modelo determinado en el paso anterior se realizó un análisis de máxima verosimilitud. El análisis bayesiano fue ejecutado con el programa Mr. Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001), configurado para correr un millón de generaciones. El

15% de los árboles generados fueron eliminados ya que es sabido que en las primeras réplicas el algoritmo muestra parámetros subóptimos.

Cuadro2. Accesiones obtenidas del NCBI de especies de *Fusarium* asociadas a tejido malformado de mango.

| Especies de <i>Fusarium</i> | Código | Código de accesoión de los genes | |
|--|------------|----------------------------------|-------------------|
| | | ef-1 α | β -tubulina |
| <i>F. sp. Brasil</i> | CML 262 | DQ452859 | DQ445781 |
| <i>F.sp. Brasil</i> | CML 345 | DQ452861 | DQ445783 |
| <i>F.sp. Brasil</i> | CML 389 | DQ452860 | DQ445782 |
| <i>F. sterilihyphosum</i> Brasil | CML 283 | DQ452858 | DQ445780 |
| <i>F. sterilihyphosum</i> S. África | NRRL 25623 | AF160300 | AF160316 |
| <i>F. mangiferae</i> India | NRRL 25226 | AF160281 | U61561 |
| <i>F. oxysporum</i> | NRRL 22902 | AF160312 | U34424 |
| <i>F. mexicanum</i> | NRRL 53147 | GU737282 | GU737494 |
| <i>F. mexicanum</i> | NRRL 53143 | GU737278 | GU737490 |
| <i>F. mexicanum</i> | NRRL 53140 | GU737275 | GU737487 |

CML=Colecao Micologica de Lavras, Universidad Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

NRRL=National Center for Agricultural Utilization Research, Preoria, Illinois USA.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Obtención de aislamientos de *Fusarium*

Un total de 143 aislamientos de *Fusarium*, obtenidos de muestras de malformación del mango colectadas en el estado de Colima en los años 2007 y 2009, fueron analizadas para identificar aquellos que producen microconidios en falsas cabezas. Considerando que en un estudio previo se determinó que aislamientos de Michoacán con microconidios en falsas cabezas asociados a tejidos malformados de mango, eran causantes de la malformación del mango (Rodríguez-Alvarado *et al.* 2008). De 94 aislamientos correspondientes al año de 2007 (Anexo III), se obtuvieron 32 que mostraron microconidios en falsas cabezas y 62 aislamientos que los presentaban en cadena. En tanto que de doce muestras de tejido floral y vegetativo de mango malformado, colectadas en tres sitios durante el año 2009, se obtuvieron 49 aislamientos de *Fusarium*, de los cuales 22 produjeron microconidios en falsas cabezas y 27 presentaron microconidios en cadena (Anexo IV).

5.2. Selección de aislamientos de *Fusarium*

Para realizar la caracterización morfológica, extracción de ADN y posterior secuenciación, se seleccionaron veinte aislamientos de *Fusarium* considerando que éstos fueran de los que producen conidios en falsas cabezas; eligiendo de dos a tres aislamientos representativos por cada muestra (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislamientos de *Fusarium* con falsas cabezas obtenidos de tejido malformado de mango seleccionados para la caracterización morfológica.

| Código de aislamiento | No. Tubo glicerol | Sitio de colecta | Tipo de malformación |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Col1S2M7PF1 | Col- 52* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M7PF3 | Col -54* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M7PF9 | Col -60* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M8PF3 | Col- 66* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M8PF12 | Col -75* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M9PF4 | Col-77* | Manzanillo | Floral |
| Col1S2M9PF 6 | Col -79* | Manzanillo | Floral |
| Col2S4M12PF2 | Col -96* | Colima | Floral |
| Col2S4M12PF4 | Col -98* | Colima | Floral |
| Col2S5M13Pv3 | Col-101* | Villa de Álvarez | Vegetativa |
| Col2S5M13Pv5 | Col-103* | Villa de Álvarez | Vegetativa |
| Col3S7M1PF1 | Col-105+ | Tecomán | Floral |
| Col4S2M1PF1 | Col-106+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M1PF2 | Col-107+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M2PF1 | Col-108+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M2PF2 | Col-109+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M3PF1 | Col-110+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M3PF2 | Col-111+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M4PF1 | Col-112+ | Manzanillo | Floral |
| Col4S2M4PF2 | Col-113+ | Manzanillo | Floral |

*Aislamientos obtenidos durante el año 2007.

+Aislamientos obtenidos durante el año 2009.

5.3. Caracterización de los aislamientos de *Fusarium*

5.3.1. Características morfológicas en medio PDA

Los caracteres morfológicos han sido usados comúnmente para la identificación de las especies de *Fusarium*. Cuando los aislamientos son cultivados en condiciones apropiadas y medios de cultivo adecuados, la caracterización puede ser hecha con bastante precisión. Para ello un número de caracteres secundarios son usados en la identidad de especies de *Fusarium*, siendo los más notables la pigmentación del medio de cultivo y el color del micelio (Leslie y Summerell 2006).

Los resultados del análisis de los 20 aislamientos seleccionados indicaron que con base al color del micelio se observaron dos grupos: el Grupo I (Col-96, Col-98, Col-101 y Col-103) presentó micelio no denso de color salmón fuerte en PDA deshidratado, mientras que en PDA fresco el color fue salmón ligero. El Grupo II (Col-52, Col-54, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77, Col-79, Col-105, Col-106, Col-107, Col-108, Col-109, Col-110, Col-111, Col-112 y Col-113) mostró micelio no denso a denso de color rojo ligero en

PDA deshidratado y violeta ligero en PDA fresco (Cuadro 4) (Fig. 2); en ninguno de los aislamientos se observó pigmentación en el agar en los medios de cultivo mencionados.

F. mangiferae produce micelio blanco flooso con pigmentos claros a púrpura oscuro en PDA mientras que *F. sterilihyphosum* presentan micelio blanco flooso con una pigmentación rosa a púrpura claro (Leslie y Summerell 2006). El micelio de *F. mexicanum* es flooso denso, con una variación de color de blanco, rosáceo a violeta claro y violeta grisáceo; mientras que la pigmentación en el reverso es amarillo claro, naranja claro, lila grisáceo, y algunas veces parcialmente violeta oscuro a púrpura en el centro de la caja (Otero-Colina *et al.* 2010).

Las características de color de micelio y pigmentación que presentan los aislamientos del Grupo I son similares a las reportadas para *F. mexicanum*; mientras que las características presentadas por los aislamientos del Grupo II son similares a las reportadas para *F. sterilihyphosum*. Sin embargo, debe considerarse que las condiciones experimentales y medios de cultivo utilizados pueden presentar variaciones en cada laboratorio, las cuales pueden hacer difícil la comparación crítica de la producción de pigmentos en el micelio y en el medio de cultivo (Summerell *et al.* 2003).

Cuadro 4. Características morfológicas de aislamientos de *Fusarium* en medio PDA.

| Código de aislamiento | Tipo de micelio | | Color de micelio | |
|--------------------------|---------------------|------------|---------------------|----------------|
| | PDA deshidratado | PDA fresco | PDA deshidratado | PDA fresco |
| Col-52 | Poco denso | Denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-54 | Poco denso | Poco denso | Rosa ligero | Violeta ligero |
| Col-60 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-66 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-75 | Poco denso | Poco denso | Rojo | Violeta ligero |
| Col-77 | Denso | Denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-79 | Denso | Poco denso | Rojo ligero | Rosa ligero |
| Col-96 | No denso | No denso | Naranja | Naranja ligero |
| Col-98 | No denso | No denso | Naranja | Naranja ligero |
| Col-101 | No denso | No denso | Naranja | Naranja ligero |
| Col-103 | No denso | No denso | Naranja | Naranja ligero |
| Col-105 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-106 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Rosa ligero |
| Col-107 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-108 | Denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-109 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-110 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-111 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-112 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |
| Col-113 | Poco denso | Poco denso | Rojo ligero | Violeta ligero |

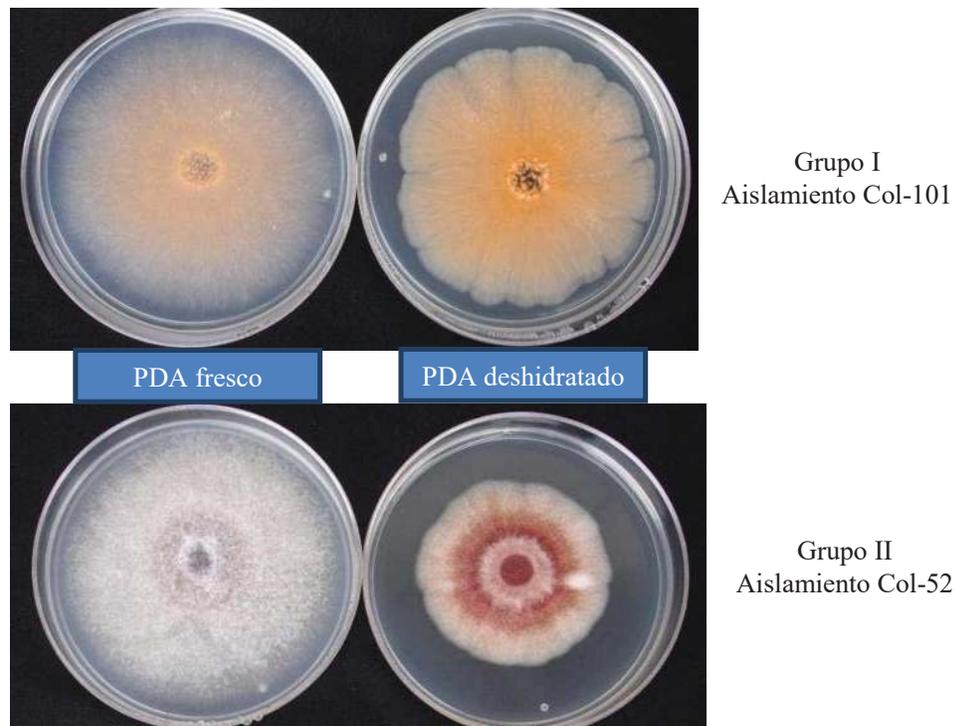


Figura 2. Aislamientos de *Fusarium* sp. en medio de cultivo PDA fresco y deshidratado.

5.3.2. Caracterización morfológica en medio CLA

5.3.2.1. Macroconidios

Los macroconidios son el carácter morfológico más importante en la identificación de especies de *Fusarium*, en algunos casos la morfología de esta espora es suficiente para identificar la especie (Leslie y Summerell 2006).

El examen morfológico de los aislamientos seleccionados de Colima reveló el conidio típico de *Fusarium* en forma de canoa; sin embargo, los aislamientos no produjeron conidios de manera abundante aunque estos se formaron en todo el micelio, y presentaron de 3 a 5 septos (Fig. 3). No se observaron esporodoquios, información que coincide con lo reportado por Leslie y Summerell(2006).

Se observó variación morfológica en la longitud de los macroconidios de los aislamientos(Cuadro 5).Las características morfológicas para las especies descritas como causantes de malformación de mango en diversas áreas productoras en el mundo son las siguientes: para *F. mangiferae* se ha reportado que tiene un rango de longitud de macroconidios de 43 a 61 μm y con 3 a 5 septos, *F. sterilihyphosum* presenta un rango de longitud de 28 a 47 μm con 4 a 6 septos (Marasaset al. 2006; Leslie y Summerell 2006) y *F.*

mexicanum presenta un rango de longitud de 21.5 a 62 μm con 3 a 5 septos (Otero-Colina *et al.* 2010).

5.3.2.2. Microconidios

Este tipo de conidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium* por lo que su presencia es un carácter importante (Leslie and Summerell 2006). Así, la forma de los microconidios, las células conidiógenas de las cuales se originan y el arreglo de los mismos en los conidióforos son un carácter potencialmente sobresaliente para el diagnóstico de la especie (Leslie y Summerell 2006).

En los aislamientos de *Fusarium* de Colima se presentaron abundantes microconidios en su mayoría de forma oval, también de forma reniforme y algunos con un septo. La presentación de conidios en el micelio fue en falsas cabezas y sus células conidiógenas fueron monofiálides y polifiálides (Figs. 4 y 5). Los rangos de longitud de microconidios registrados para el Grupo I de aislamientos que coincidieron con *F. mexicanum* fue de 10 μm a 17.7 μm y para el Grupo II de aislamientos de *Fusarium* de Colima similares a *F. sterilihyphosum* fue de 7.5 μm a 17.5 μm (Cuadro 5).

La formación de clamidosporas no se observó en ninguno de los aislamientos en los diferentes medios de cultivos empleados y bajo las condiciones de laboratorio utilizadas. Esto concuerda con lo reportado para las especies causantes de malformación anteriormente descritas (Leslie and Summerell 2006). Así mismo la presencia de hifas enrolladas estériles no se registró en ninguno de los aislamientos analizados. Este resultado difiere de lo reportado para *F. sterilihyphosum* (Britzet *et al.* 2002). En *F. mexicanum* se detectaron aislamientos que no producían hifas enrolladas estériles mientras que otros aislamientos sí las producían (Otero-Colina *et al.* 2010). La producción de estas hifas distingue a estos taxones de *F. mangiferae* (Britzet *et al.* 2002). Sin embargo, las características morfológicas pueden variar debido a cambios en las condiciones de crecimiento micelial por temperatura y medios de cultivo (Leslie y Summerell 2006).

Cuadro 5. Características morfológicas de aislamientos de *Fusarium* sp. de Colima en medio CLA, con células conidiógenas mono y polifálides.

| Código de aislamiento | Promedio de macroconidio (μm) | Longitud | | |
|-----------------------|--|---|--|---|
| | | Rango de macroconidio (μm) | Promedio de microconidio (μm) | Rango de microconidio (μm) |
| Col-52 | 43.8 | 35-55 | 12.5 | 10-15 |
| Col-54 | 43.2 | 28.8-50.4 | 12.04 | 12-13.2 |
| Col-60 | 46.6 | 37.5-55 | 12.6 | 10-15 |
| Col-66 | 41.8 | 35-52.5 | 12.4 | 10-15 |
| Col-75 | 41.7 | 27.5-50 | 12.6 | 10-17.5 |
| Col-77 | 41.8 | 27.5-57.5 | 12.7 | 10-15 |
| Col-79 | 48.6 | 35-57.5 | 12.5 | 10-15 |
| Col-96 | 49.1 | 37.5-62.5 | 13.3 | 10-17.5 |
| Col-98 | 51.0 | 35-62.5 | 13.1 | 10-20 |
| Col-101 | 40.8 | 36-50.4 | 12.0 | 12 |
| Col-103 | 43.6 | 32.5-57.5 | 13.3 | 10-17.5 |
| Col-105 | 43.5 | 32.5-55 | 10.5 | 10-13.75 |
| Col-106 | 41.6 | 35-55 | 12.2 | 10-15 |
| Col-107 | 42.8 | 27.5-57.5 | 12.2 | 7.5-17.5 |
| Col-108 | 47.0 | 32.5-55 | 12.7 | 10-15 |
| Col-109 | 46.2 | 37.5-62.5 | 13.0 | 10-17.5 |
| Col-110 | 40.4 | 32.5-50 | 11.7 | 10-12.5 |
| Col-111 | 42.9 | 35-55 | 11.5 | 10-15 |
| Col-112 | 42.4 | 35-55 | 12.2 | 10-15 |
| Col-113 | 43.6 | 30-55 | 13.3 | 8.75-15 |



Figura 3. Macroconidios típicos del género *Fusarium*.



Figura 4. Monofiálides con conidios en falsas cabezas de aislamientos de *Fusarium* en medio CLA.



Figura 5. Células conidiógenas (Polifiálides) de aislamientos de *Fusarium* en medio CLA.

5.4. Pruebas de patogenicidad

En las plantas de mango de la variedad Haden utilizadas en las pruebas de patogenicidad aparecieron los síntomas de malformación seis semanas después de haber sido inoculadas con los aislamientos de *Fusarium*. El aislamiento Col-113, incluido en el Grupo II de aislamientos, indujo los síntomas de malformación flora típica de la enfermedad (Fig. 6). Para reaislar al patógeno de las plantas inoculadas que mostraron síntomas, se sembraron explantos del tejido con malformación en medio PDA (Cuadro 6). Para ello se utilizaron diferentes partes de tejido como flores, frutos pequeños y botones. En todos los casos se observó el crecimiento micelial con las mismas características del aislamiento de *Fusarium* inoculado inicialmente.

Todos los aislamientos incluidos en el Grupo I reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad que son malformación vegetativa y floral a las seis semanas después de haber sido inoculados (Fig. 7). El aislamiento Col-103 indujo los síntomas cinco semanas después de haberse inoculado.

Las plantas control inoculadas con agua destilada estéril no presentaron síntomas de la enfermedad y no se obtuvieron aislamientos de *Fusarium* a partir de tejidos sembrados en PDA (Figs. 8 y 9).

Cuadro 6. Aislamientos de *Fusarium* de Colima seleccionados para pruebas de patogenicidad.

| Código de aislamiento inoculado | Re aislamiento de <i>Fusarium</i> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| Col-96 | + |
| Col-98 | + |
| Col-101 | + |
| Col-103 | + |
| Col-105 | + |
| Col-54 | - |
| Col-66 | - |
| Col-107 | - |
| Col-111 | - |
| Col-113 | + |



Figura 6. Síntomas de malformación floral en mango variedad Haden inoculada con *Fusarium* sp. aislamiento Col-113.



Figura 7. Síntomas de malformación vegetativa ocasionados en mango variedad Haden inoculada con *Fusarium* sp. aislamiento Col-105.

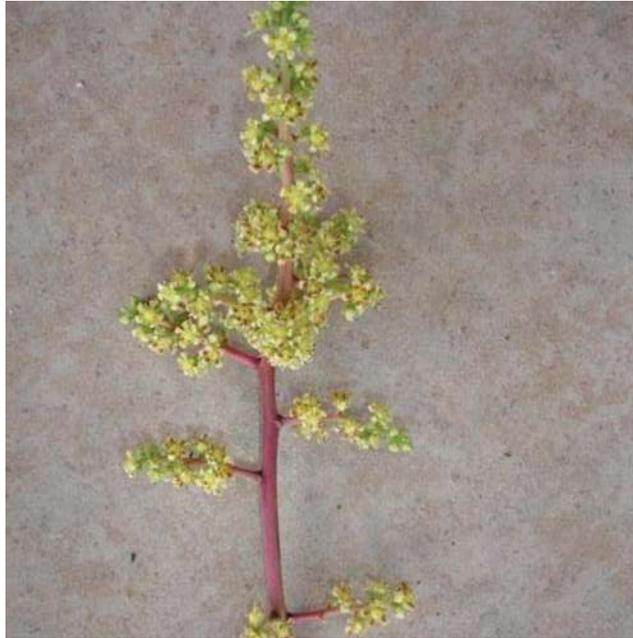


Figura 8. Panícula floral de planta de mango control inoculada con agua destilada estéril.



Figura 9. Planta de mango control inoculada con agua destilada estéril.

5.5. Extracción de ADN y amplificación de los genes $ef-1\alpha$ y β -tubulina

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los aislamientos produjo suficiente cantidad y de buena calidad (Fig. 10A). Los genes factor de elongación ef-1 α (Fig. 10B) y β -tubulina (Fig. 10C) se amplificaron por PCR. Se obtuvo la secuencia de los genes amplificados para cada uno de los aislamientos.

Utilizando el programa Sequencher 4.8, se observó una mejor calidad en las secuencias obtenidas cuando el ADN de los aislamientos se extrajo con el kit comercial en comparación con el protocolo de Mahuku (2004).

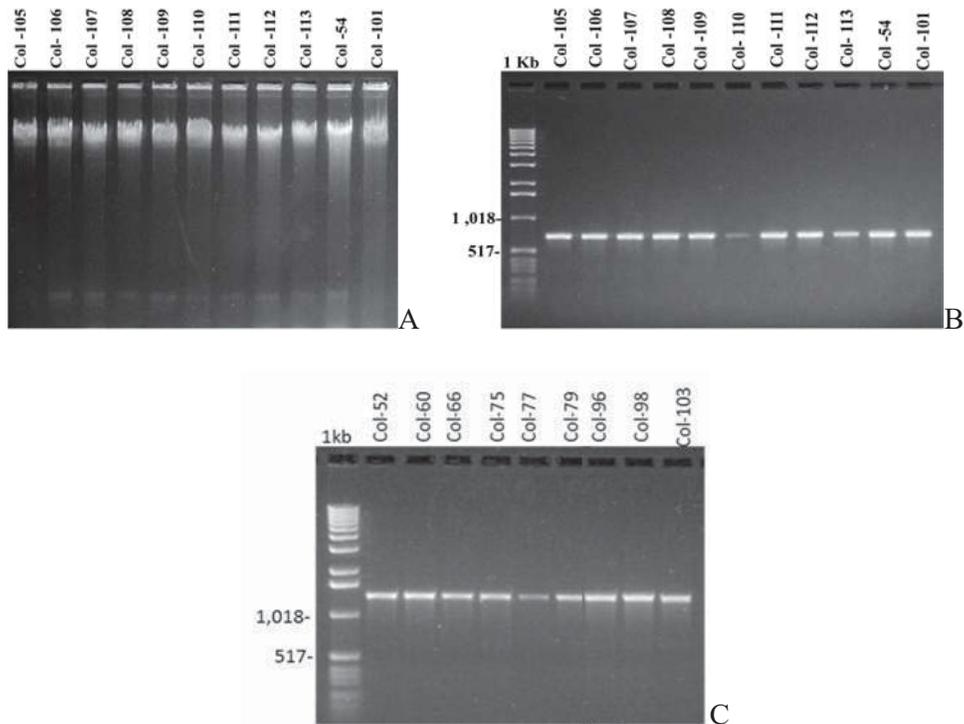


Figura 10. Geles representativos de la extracción de ADN (A), amplificación por PCR de los fragmentos del gen factor de elongación (B) y β -tubulina (C) de aislamientos de *Fusarium* de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima.

5.6. Análisis filogenéticos

Se seleccionaron 9 aislamientos de *Fusarium* para realizar estudios filogenéticos: dos aislamientos obtenidos en árboles localizados en la ciudad de Colima (Col-96, Col-98), un aislamiento obtenido en Villa de Álvarez (Col-103) y seis aislamientos obtenidos del municipio de Manzanillo (Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79). Los fragmentos de ADN amplificados fueron secuenciados en ambos sentidos para los diferentes genes: factor de elongación de la traslación $ef-1\alpha$, β -tubulina y calmodulina. Los aislamientos Col-54, Col-105, Col-106, Col-107, Col-108, Col-109, Col-110, Col-111, Col-112 y Col-113 no se incluyeron en el análisis por no presentar secuencias de buena calidad para los genes β -tubulina y calmodulina.

Se utilizaron las secuencias obtenidas para constituir un alineamiento mediante el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) dentro del programa BioEdit, obteniendo una matriz de 19 taxones para el gen factor de elongación y β -tubulina; se eliminaron los extremos de las secuencias, se redujo la longitud de las mismas, así de esta forma el gen $ef-1\alpha$ quedó con 618 pb y el gen β -tubulina con 459 pb.

5.6.1. Factor de elongación

El alineamiento obtenido para este gen mostró que los aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103 presentaron 16 cambios en la posición de las bases con respecto al resto de los aislamientos de Colima (Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79). Los cambios encontrados incluyen cuatro transversiones, nueve transiciones, dos inserciones y una delección (Anexo V). Los aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103 presentaron similitud con los aislamientos de *F. mexicanum* excepto por la diferencia de dos bases; el resto de los aislamientos del estado de Colima presentó identidad completa con los aislamientos de *F. sterilihyphosum*.

El análisis de parsimonia produjo un solo árbol, se obtuvo un índice de consistencia de 0.95 y un índice de retención de 0.96. El cladograma obtenido mostró dos grupos en los aislamientos de Colima, los cuales corresponden con los grupos descritos durante la caracterización cultural y morfológica: el Grupo I conformado por tres aislamientos (Col-96, Col-98 y Col-103), estos taxones forman un clado que a su vez se encuentra incluido en el clado donde se presenta *F. mexicanum*; lo que indica que estos aislamientos están más relacionados con esta especie.

El Grupo II conformado por seis aislamientos (Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79) forman una politomía donde también se encuentran las cepas de *F.*

sterilihyphosum y dentro de este clado se encuentran otro clado con las cepas de *Fusarium* sp. de Brasil (Fig. 11).

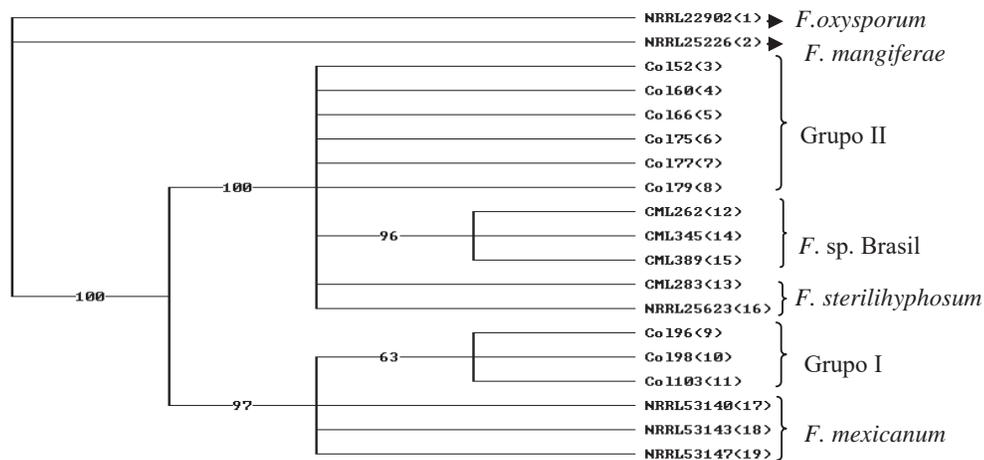


Figura 11. Árbol parsimonioso obtenido del gen factor de elongación de taxones de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango.

5.6.2. β -tubulina

Los aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103 mostraron tres posiciones diferentes respecto al resto de los aislamientos de Colima, dostransiciones y unatransversión (Anexo VI); presentando secuencias idénticas a las de *F. mexicanum*. Los aislamientos Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79 presentaron secuencias similares a *F. sterilihyphosum* excepto por la posición de una base.

El análisis de parsimonia produjo un solo árbol con un índice de consistencia de 1.0 y un índice de retención de 1.0. La topología del árbol obtenido mostró un clado no resuelto agrupando todos los taxones analizados excepto *F. mangiferae* y *F. oxysporum*; las cepas de *F. sterilihyphosum* se agrupan en un clado cercano a las cepas de *Fusarium* sp. de Brasil. Los taxones de *F. mexicanum* se presentan en el mismo clado que los aislamientos Col.96, Col-98 y Col-103 así como el resto de los aislamientos de Colima los cuales forman una politomía (Fig. 12).

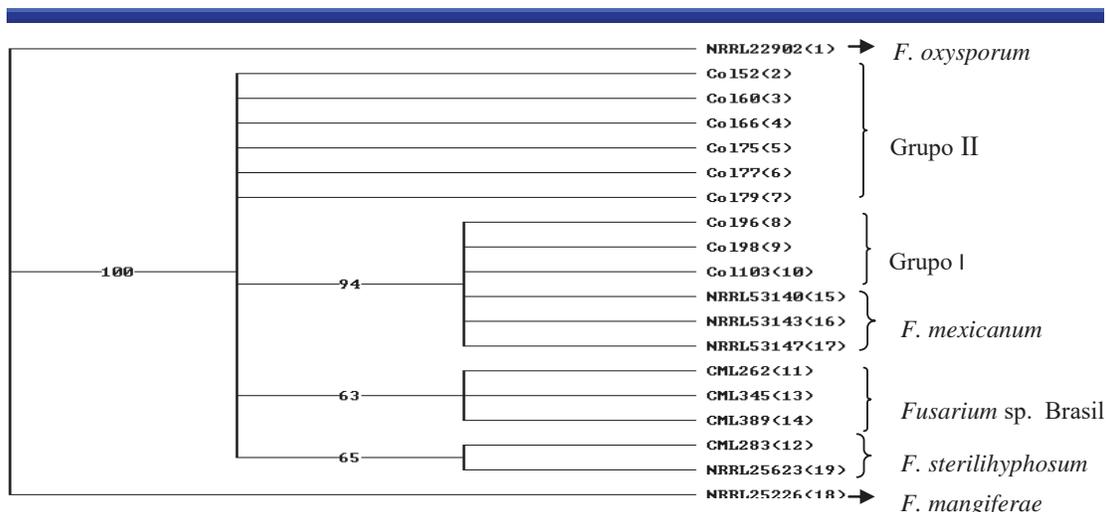


Figura 12. Árbol parsimonioso obtenido del gen β -tubulina de taxones de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango.

5.6.3. Calmodulina

El alineamiento para el gen calmodulina no fue posible llevarlo a cabo ya que las secuencias no fueron de buena calidad, los iniciadores de este gen se reporta que amplifican 668 pb aproximadamente (O'Donnel *et al.* 2000); mientras que en las secuencias obtenidas de *Fusarium* sp. de aislamientos del estado Colima los iniciadores CL11 y CL22 únicamente amplificaron 200 pb y 440 pb respectivamente. También las secuencias obtenidas con el iniciador CL22, por presentar mayor cantidad de bases, se intentó alinearlas con otros taxones de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango; sin embargo, fue difícil encontrar sitios homólogos, solamente 250 pb fueron alineados. Y se observaron varias regiones con gaps, por lo que no se utilizó esta matriz de datos para ningún análisis filogenético por no ser confiable.

5.6.4. Combinación de genes factor de elongación a ef-1 α y β -tubulina

Para este análisis se combinaron dos matrices de los genes estudiados ef-1 α y β -tubulina con un total de 1077 caracteres, con el objetivo de obtener árboles mejor resueltos. En dicho análisis se obtuvo un solo árbol parsimonioso (Fig. 13) con un índice de consistencia de 0.96 y un índice de retención de 0.97.

El cladograma obtenido mostró que los aislamientos de Colima se presentaron como un grupo parafilético, originando dos clados diferentes dentro de los aislamientos de *Fusarium* de Colima que no comparten el mismo ancestro común inmediato. Los aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103 se presentan en un clado separado de *F. mexicanum*

pero más cercano a esta especie en comparación con el resto de los aislamientos; mientras que los aislamientos Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79 aparecen en un solo clado; *F. sterilihyphosum* y cepas de Brasil, se encuentran en clados separados pero cercanos a los aislamientos de *Fusarium* de Colima anteriormente mencionados (Fig. 13).

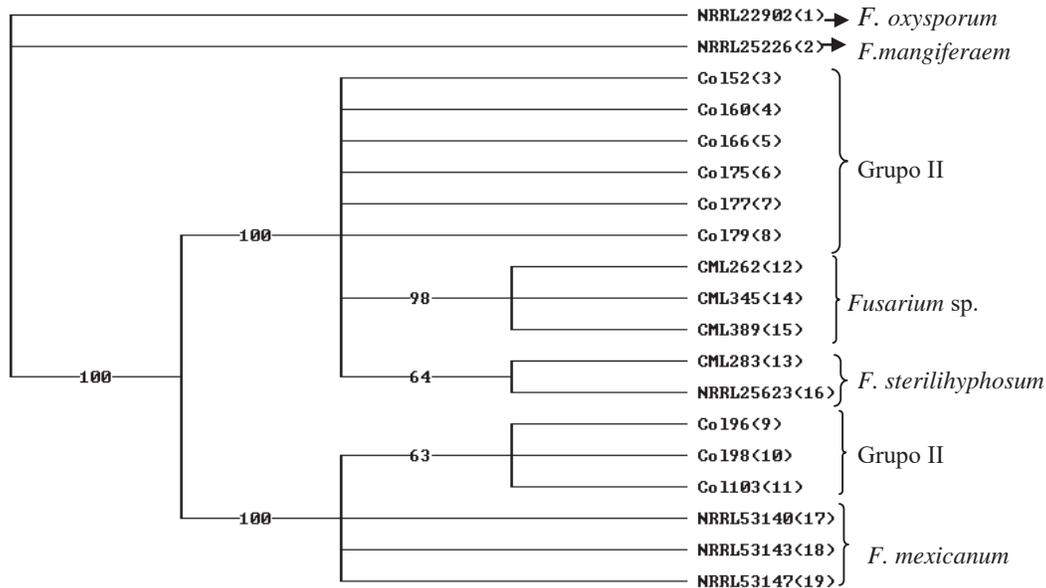


Figura 13. Árbol parsimonioso obtenido de la combinación de los genes del factor de elongación y β -tubulina de taxones de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango.

El árbol generado con la combinación de genes mostró un clado más en comparación con los árboles obtenidos mediante un solo gen, lo que nos indica que se debe agregar la secuencia de otros genes para obtener árboles mejor resueltos.

La topología de los árboles para cada gen fue congruente en los diferentes análisis filogenéticos: de distancia, máxima parsimonia, máxima verosimilitud y el análisis bayesiano.

Los resultados obtenidos del análisis morfológico y filogenético indican que los aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103 son *F. mexicanum*. El análisis filogenético de los aislamientos Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79, no presenta una definición clara sobre la identidad de estos aislamientos; sin embargo, dada la gran diferencia que hay entre las secuencias del gen del factor de elongación entre los dos grupos de aislamientos, podemos indicar con certeza que los aislamientos del grupo más numeroso que no son *F. mexicanum* podría tratarse de un nuevo taxón. En el análisis filogenético llevado a cabo por Otero-Colina *et al.* (2010) en donde se incluyó el aislamiento Col-54 (GR54, NRRL53148), se reportó que tal aislamiento podría pertenecer a un nuevo taxón de

Fusarium. En dicho estudio se utilizó el gen del factor de elongación y β -tubulina para comparar taxones de *Fusarium* del clado Americano, asociados con la malformación del mango. La secuencia del gen del factor de elongación reportada para el aislamiento Col-54 (Otero-Colina *et al.* 2010) es idéntica a la reportada en el presente trabajo para el grupo de aislamientos que podrían representar un nuevo taxón patogénico en mango. Es importante señalar que este es el primer reporte de sobre la patogenicidad de este nuevo taxón, ya que se indujeron síntomas de malformación en plantas de mango variedad Haden inoculadas con una suspensión de conidios. Para confirmar que este es un taxón diferente, será necesario llevar a cabo estudios adicionales con diferentes regiones genómicas, algunas utilizadas en *F. graminearum* son el espaciador intergénico del ADN ribosomal (IGS) (Carter *et al.* 2000), 3-O acetiltransferasa, fosfato permeasa, ammonioligasa (Geiser *et al.* 2004) y podrían ser usadas en la identificación de especies de *Fusarium* causantes de la enfermedad.

Los taxones de *Fusarium* descritos que causan malformación del mango se han colocado taxonómicamente en un complejo de especies del género *Gibberella fujikuroi* (GFSC). Estas y otras especies de *Fusarium* han sido ubicadas en la Sección *Liseola* de *Fusarium* descrita por Wollenweber y Reinking (1935). Recientemente, se propuso una hipótesis biogeográfica para este grupo de especies utilizando como fundamento el análisis filogenético de varias regiones genómicas (O'Donnell *et al.* 1998). Específicamente se sugirió separar las especies de GFSC en tres clados denominados Africano, Asiático y Americano, esto basado en la suposición de que el origen de cada clado está asociado con el centro de origen del hospedante asociado y tomando en cuenta los eventos asociados con la fragmentación ambiental que ocurrió durante la separación del continente Gondwana (O'Donnell *et al.* 1998). Esta hipótesis concuerda con el reloj molecular estimado del surgimiento de *Fusarium* (Summerell *et al.* 2010). La hipótesis biogeográfica planteada tiene datos publicados que la apoyan y otros que la contradicen (Kvas *et al.* 2009; Summerell *et al.* 2010).

El mango es una planta que tuvo su centro de origen en Asia, es atacado por varias especies de *Fusarium* que causan síntomas de malformación floral y vegetativa. Estas especies de *Fusarium* se encuentran en diferentes clados. Así, *F. mangiferae* pertenece al clado Asiático, mientras que *F. sterilihyphosum*, *F. mexicanum* y *F. 'subglutinans'* pertenecen al clado Americano. Se ha sugerido que *F. mangiferae* acompañó al mango cuando dicho cultivo fue diseminado en Asia y el Medio Oeste. Para el caso de *F. sterilihyphosum*, se considera que habitaba en algún hospedante nativo de América del Sur

y saltó al mango cuando este fue introducido en la región. Sin embargo esta hipótesis no explica la presencia de *F. sterilihyphosum* causando malformación en Sudáfrica (Summerellet *al.* 2010).

VI. CONCLUSIONES

Las características morfológicas y el análisis filogenético permitieron separar a los aislamientos de *Fusarium* del estado de Colima en dos clados diferentes, uno con aislamientos Col-96, Col-98 y Col-103, el cual es considerado en este estudio idéntico a *F. mexicanum*. Un segundo clado con los aislamientos Col-52, Col-60, Col-66, Col-75, Col-77 y Col-79, que es similar a *F. sterilihyphosum* y *Fusarium* sp., sin embargo es necesario llevar a cabo estudios adicionales con más genes para determinar su estatus taxonómico.

F. mangiferae no se encontró presente en los aislamientos de *Fusarium* del estado de Colima analizados.

Los postulados de Koch fueron completados para los taxones seleccionados considerados como *F. mexicanum*; mientras que para los aislamientos similares a *F. sterilihyphosum*, solamente el aislamiento Col-113 reprodujo los típicos síntomas de la enfermedad.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. **Plant Pathology**.5a ed. Elsevier Academic Press.Department of Plant Pathology University of Florida.USA.pp.948.
- Britz, H., T. A. Coutinho, M. J. Wingfield, W. F. O. Marasas, T. R. Gordon y J. F. Leslie. 1999. ***Fusariumsubglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberellafujikuroi* species complex**.*Applied Environmental Microbiology* 65:1198-1201.
- Britz, H., E. T. Steenkamp, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, W. F. O. Marasasy M. J. Wingfield. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation**.*Mycologia* 94: 722-730.
- Correll, J. C., C. J. R. Klittichy J. F. Leslie. 1987. **Nitrate nonutilizing mutants of *Fusariumoxysporum* and their use in vegetative compatibility tests**.*Phytopathology* 77: 1640-1646.
- Carter, J.P., H.N. Rezanoor, A.E. Desjardins y P. Nicolson. 2000. **Variation in *Fusariumgramineum* isolates from Nepalassociated with their host of origin**. *Plant Pathology*49: 452-460.
- Dang, J.K. y B.S. Daulta. 1982. **Mango malformation – a review**. *Pesticides* 16: 5–11.
- Díaz-Balderas, V. y S. Romero-Cova. 1980. **Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos**. *Agrociencia*39: 35-40.
- Enciclopedia de los Municipios de México. 2005. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED), Gobierno del Estado de Colima[En línea]
<http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/Colima/Mpios/06009a.htm>
[Consultada: 23 de Noviembre de 2010]
- FAOSTAT. 2009. [En línea]
<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.p/FAOSTATDatabase/>.
[Consultada: 29 de Marzo de 2011].
- Freeman, S., M. Maimon y Y. Pinkas.1999. **Use of GUS transfromants of *Fusariumsubglutinans*for determining etiology of mango malformation disease**. *Phytopathology* 89:456-461.
- Gamliel-Atinsky, E., S.Freeman, A.Sztejnberg, M. Maymon, R.Ochoa, E.Belausov yE.Palevsky.2009a. **Interaction of the mite *Aceriamangiferae* with *Fusariummangiferae*, the causal agent of mango malformation disease**.*Phytopathology* 99:152-159.
-

- Gamliel-Atinsky, E., A. Sztejnberg, M. Maymon, D. Shtienberg, y S. Freeman. 2009b. **Inoculum availability and conidial dispersal patterns of *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease.** *Phytopathology* 99:160-166.
- Gamliel-Atinsky, E., A. Sztejnberg, M. Maymon, H. Vintal, D. Shtienberg y S. Freeman. 2009c. **Infection dynamics of *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease.** *Phytopathology* 99:775-778.
- Geiser, D., M. Jimenez-Gasco, S. Kang, I. Makawsk, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. Kudau, y K. O'Donnell. 2004. ***Fusarium-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium.*** *European Journal Plant Pathology* 110:473-479.
- Guzmán, E. C. 2004. **Malformación o “Escoba de bruja” o “Flor macho del mango” conocimiento, identificación, prevención y disminución.** INIFAP – CIRNO. Campo Experimental Sur de Sinaloa. Folleto técnico No. 5. Mazatlán Sinaloa, México. 41 pp.
- Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. **MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny.** *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ibrahim, A. N., M. M. Satour, Z. M. El-Tobshy, y M. A. Abdel Sattar. 1975. **Pathological and histological note on mango malformation in Egypt.** *Current Science* 44:443-444.
- Jost, W., A. Baur, P. Nick, R. Reski y G. Gorr. 2004. **A large plant beta-tubulin family with minimal C-terminal variation but differences in expression.** *Gene* 340:151–160.
- Kausar, A.G. 1959. **Malformation of inflorescence in mango.** *Punjab Fruit Journal* 22: 19–21.
- Kvas, M., W.F.O. Marasas, B. D. Wingfield, M. J Wingfield y E.T. Steenkamp. 2009. **Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex.** *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Kumar, J. y S. P. S. Beniwal. 1992. **Mango malformation. In: Plant Diseases of International Importance,** ed. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay. Prentice Hall. New York. 456 pp.
- Kumar, J., U. S. Singh y S. P. S. Beniwal. 1993. **Mango malformation: one hundred years of research.** *Annual Review of Phytopathology* 31: 217-232.
- Leslie, J. F. 1995. ***Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits.** *Canadian Journal of Botany* 73:S282-291.

-
- Leslie, J. F. y B. A. Summerell. 2006. **The *Fusarium* laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Lima, C. S., J. H. A. Monteiro, N. C. Crespo, S. S. Costa, J. F. Leslie y L. H. Pfenning. 2009. **VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil**. *Plant Pathology* 123:17-26.
- Mahuku, G. S. 2004. **A simple extraction method suitable for PCR- based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA**. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 71-81.
- Manicom, B. Q. 1989. **Blossom malformation of mango**. South African Mango Grower's Association Yearbook 10: 11-12.
- Marasas, W. F. O., R. C. Ploetz, M.J. Wingfield, B. D. Wingfield y E. T. Steenkamp. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species**. *Phytopathology* 96:667-672.
- Moreira, D., S. Kervestin, O. Jean-Jean y H. Philippe. 2002. **Evolution of Eukaryotic Translation Elongation and Termination Factors: Variations of Evolutionary Rate and Genetic Code Deviations**. *Molecular Biology and Evolution* 19(2):189-200.
- Narasimhan, M.J. 1954. **Malformation of panicles in mango incited by spp. of *Eriophyes***. *Current Science* 23: 297-298.
- Nicholson, R. I. D. y J. van Staden. 1988. **Cytokinins and mango flower malformation. Tentative identification of the complement in healthy and malformed inflorescences**. *Journal Plant Physiology* 132:720-724.
- Noriega, C. D. H. 1996. **"Escoba de bruja" del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado**. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 72 pp.
- O'Donnell, K. y E. Cigelnik. 1997. **Two divergent intragenomic DNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous**. *Molecular Phylogenetic Evolution* 7: 103-106.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg. 1998. **Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Mycologia* 90:465-493.
- O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, T. Aoki y E. Cigelnik. 2000. **A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species**. *Mycoscience* 41:61-78.
-

-
- Otero-Colina, G., G. Rodríguez-Alvarado, S. Fernández-Pavía, M. Maymon, R. Ploetz, T. Aoki, K. O'Donnell y S. Freeman. 2010. **Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in México, *Fusarium mexicanum* sp. nov.** *Phytopathology* 100 (11):1176-1184.
- Peterson, S. W. 2006. **Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Eupenicillium* species.** *Revista Iberoamericana de Micología* 23:134-138.
- Ploetz, R. C. y N. Gregory. 1993. **Mango malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships within and among strains from different orchards.** *Acta Horticulture* 341:388-394.
- Ploetz, R. C. 2003. **Diseases of Mango.** In: **Diseases of Tropical Fruit Crops**, ed. R. C. Ploetz. CABI Publishing. Cambridge, USA.
- Ploetz, R. C. y S. Freeman. 2009. **Foliar, Floral and Soilborne disease.** En: **Litz, R. E. The Mango, 2^a Edition: Botany, Production and uses.** CAB International. University of Florida. USA. pp. 231-294.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. **ModelTest: Testing the model of DNA substitution.** *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Prasad, A., H. Singh y T.N. Shukla. 1965. **Present status of mango malformation disease.** *Indian Journal of Horticulture* 22: 254-265.
- Prieto, M. J. J., J. E. Cobarrubias, C. A. Romero y M. O. Figueroa. 2005. **Paquetes Tecnológicos para cultivos Agrícolas en el Estado de Colima.** Secretaría de desarrollo rural 003: 1-50.
- Quezada-Gutiérrez, M.C. 2008. **Caracterización morfológica de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango con malformación en el estado de Colima.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 55 pp.
- Rodríguez-Alvarado, G., S. Fernández-Pavía, R. C. Ploetz, and Valenzuela-Vázquez. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *Fusarium mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, México.** *Plant Pathology* 57:781.
- SIAP.2009. [En línea]
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_contet&view=article&id=10&Itemid=15
[Consultada: 29 de Marzo de 2011]
-

- Singh, Z. y B.S. Dhillon.1989.**Hormonal changes associated with vegetative malformation of mango (*Mangifera indica*L.).** *Journal of Phytopathology*125: 193–197.
- Steenkamp, E. T., B. D. Wingfield, T. A. Coutinho, M. J. Wingfield y W. F. O.Marasas. 1999. **Differentiation of *Fusariumsubglutinans* f. sp. pini. by histone gene sequence data.** *Applied Environmental Microbiology* 65:3401-3406.
- Steenkamp, E. T., H. Britz, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, W. F. O.Marasas y M. J. Wingfield.2000. **Molecular characterization of *Fusariumsubglutinans* associated with mango malformation.** *Molecular Plant Pathology* 1(3):187-193.
- Steenkamp, E. T. 2000. **Molecular taxonomic studies of selected species in the *Gibberellafujikuroi*complex.**University of Pretoria.159 pp.
- Summanwar, A. S., S. P Raychoudhuri y S. C. Pathak. 1966. **Association of the fungus *Fusarium* sp. Sheld. With the malformation in mango.***Indian Phytopathology* 19:227-228.
- Sumerell, B. A., B.Salleh, y J. F. Leslie. 2003. **A utilitarian approach to *Fusarium*identification.** *Plant Disease* 87(2):117-128.
- Summerell, B. A., M. H. Laurence, E.C. Y. Liew y J. F. Leslie. 2010. **Biogeography and Phylogeography of *Fusarium*: a review.** *Fungal Diversity* 44:3-13.
- Swfford, D. L. 2003. **PAUP.Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods).v.4.0b10.**Sinaur Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007.**MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic AcidsResearch* 22: 4673-4680.
- vanStaden, J. y R. J. D Nicholson. 1989. **Cytokinins and mango flower malformation. The Cytokinin complement produced by *Fusariummoniliforme* and the ability of the fungus to incorporate (8-¹⁴C) adenine into cytokinins.***Physiological and Mololecular Plant Pathology*35:423-431.
- vanStaden, J., A.D. Bayley yS. Macrae.1989.**Cytokinins and mango flower malformation. III. The metabolism of (3H) iso-pentenyladenine and (8-14C)**

- zeatin by *Fusariummoniliforme*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 433–438.
- Varma, A., S. P. Raychoudhuri, V. C. Lele y A. Ram. 1974. **Towards the understanding of the problem of malformation of mango (*Mangifera indica*).** *Proceedings Indian National Science Academy*. 37:291-300.
- Wollenweber, H. W. y O. A. Reinking. 1935. ***Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung.*** Verlag Paul Parey, Berlin, Germany. (F, 8, 9, *acuminatum, chlamydosporum, compactum, culmorum, decemcellulare, dimerum, equiseti, lactis, lateritium, longipes, merismoides, nygamai, phyllophilum, poae, sambucinum, scirpi, semitectum, sporotrichioides, subglutinans, udum, venenatum*).
- Zheng, Q. y R. Ploetz. 2002. **Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay.** *Plant Pathology* 51:208-216.

Anexo I. Protocolo de extracción de ADN - *Fusarium* (Mahuku 2004).

1. Colocar 150-300 mg de micelio deshidratado en un microtubo estéril y etiquetado.
 2. Moler micelio con nitrógeno líquido y un pistilo estéril.
 3. Almacenar a -20° C o procesar inmediatamente.
 4. Agregar a cada microtubo con muestra 300 µl de TES.
 5. Homogenizar con pistilo estéril por 2-3 min.
 6. Mezclar cada microtubo por 30 seg.
 7. Agregar a cada microtubo 200 µl de TES, 1.25 µl de Proteinasa K [200 mg/ml].
 8. Mezclar cada microtubo por 30 seg.
 9. Incubar a 65° C en baño María por 30 min.
 10. Agregar a cada microtubo 250 µl de acetato de amonio (NH₄ Ac 7.5 M).
 11. Colocar microtubos en hielo por 10 min.
 12. Centrifugar a máxima revolución por minuto 15 min a 4° C.
 13. Transferir sobrenadante a microtubo nuevo estéril.
 14. Agregar a cada microtubo 750 µl de isopropanol.
 15. Almacenar microtubos a -20° C toda la noche.
 16. Centrifugar a máxima revolución por minuto 20 min a 4° C.
 17. Decantar sobrenadante.
 18. Agregar a cada microtubo 800 µl de Etanol al 70% frío, no usar vortex para mezclar.
 19. Centrifugar a máxima revolución por minuto 10 min a 4° C.
 20. Decantar sobrenadante.
 21. Colocar microtubos abiertos invertidos sobre toallas de papel estéril para drenar la pastilla, posteriormente invertir microtubos y colocarlos en la gradilla para que la pastilla se seque. Puede secar pastilla en SpeedVac. En este paso del protocolo, generalmente la pastilla no es visible. Los pasos a continuación se usan para remover carbohidratos; sin embargo, es posible perder la pastilla.
 22. Agregar a cada microtubo 250 µl de TE pH 8.0, resuspender la pastilla.
 23. Centrifugar a máxima revolución por minuto 15 min.
 24. Transferir sobrenadante a microtubo nuevo estéril. Etiquetar microtubos y colocar en hielo.
 25. Agregar a cada microtubo con las pastillas 250 µl de TE pH 8.0, resuspender.
 26. Centrifugar máxima revolución por minuto 15 min.
 27. Transferir sobrenadante a microtubo en hielo con el sobrenadante previo.
 28. Agregar a cada microtubo 5 µl de RNasa A [20 mg x ml].
-

29. Incubar a 37° C por 60 min.
30. Centrifugar por 10 segundos.
31. Agregar a cada microtubo 250 µl de acetato de amonio (NH₄ Ac 7.5 M).
32. Colocar microtubos en hielo por 20 min.
33. Centrifugar máxima revolución por minuto 15 min.
34. Transferir sobrenadante a microtubo nuevo, estéril, etiquetado.
35. Agregar a cada microtubo 750 µl de isopropanol.
36. Almacenar a -20° C.
37. Centrifugar a máxima revolución por minuto 20 min.
38. Decantar sobrenadante.
39. Agregar a cada microtubo 800 µl de Etanol al 70% frio. No use vortex.
40. Centrifugar máxima revolución por minuto 5 min.
41. Decantar sobrenadante.
42. Colocar microtubos abiertos invertidos sobre toallas de papel estéril para drenar la pastilla, posteriormente invertir microtubos y colocarlos en la gradilla para que la pastilla se seque. Puede secar pastilla en SpeedVac.
43. Resuspender pastilla con 20-50 µl de TE pH 8.0 (el volumen utilizado dependerá del tamaño de la pastilla).
44. Almacenar a -20° C.

Anexo II. Protocolo de extracción de ADN Wizard® Genomic DNA Purification Kit, (Promega).

- 1.- Moler el micelio en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino.
- 2.- Agregar 40 mg del micelio molido a un microtubo de 1.5 ml previamente etiquetados.
- 3.- Agregar 600 µl de NucleiLysisSolution y mezclar de 1 a 3 segundos para humedecer el tejido (hasta homogeneizar la muestra).
- 4.- Incubar a 65°C durante 15 minutos.
- 5.- Agregar 3 µl de RNaseSolution. Mezclar invirtiendo el tubo de 2 a 5 veces.
- 6.- Incubar la muestra a 37°C por 15 minutos.
- 7.- Enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 8.- Agregar 200 µl de ProteinPrecipitationSolution y mezclar vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos.
- 9.- Centrifugar por 3 minutos a 16,000 x g. La precipitación de las proteínas formará una pastilla.
- 10.- Cuidadosamente remover el sobrenadante el cual contiene el ADN, transferirlo a microtubos de 1.5 µl previamente etiquetados conteniendo 600 µl de Isopropanol a temperatura ambiente.
- 11.- Mezclar suavemente los tubos invirtiendo varias veces hasta observar una masa visible de ADN.
- 12.- Centrifugar a 16,000 x g por 1 minuto.
- 13.- Decantar el sobrenadante.
- 14.- Agregar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente.
- 15.- Invertir los tubos varias veces para lavar la pastilla de ADN.
- 16.- Centrifugar a 16,000 x g por 1 minuto.
- 17.- Decantar el sobrenadante.
- 18.- Invertir los tubos sobre toallas de papel estéril para secar la pastilla a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 19.- Agregar 100 µl de DNA RehydrationSolution, rehidratar el DNA por incubación de los tubos toda la noche a 4 °C.
- 20.- Almacenar el DNA de 2 a 8 °C.

Anexo III. Aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima en el año de 2007.

| Código de aislamiento | No. tubo glicerol | Municipio | Árbol | Tipo de malformación | Presentación de conidios |
|------------------------------|--------------------------|------------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Col1S1M1Pv1 | Col 1 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv2 | Col 2 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv3 | Col 3 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv4 | Col 4 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv5 | Col 5 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv6 | Col 6 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv7 | Col7 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv8 | Col 8 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M1Pv9 | Col 9 | Tecomán | 1 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv1 | Col 10 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv2 | Col 11 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv3 | Col 12 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv4 | Col 13 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv5 | Col 14 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv6 | Col 15 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv8 | Col 16 | Tecomán | 2 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M2Pv9 | Col 17 | Tecomán | 2 | Vegetativa | No inoculado |
| Col1S1M3Pv1 | Col 18 | Tecomán | 3 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M3Pv2 | Col 19 | Tecomán | 3 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M3Pv3 | Col 20 | Tecomán | 3 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M3Pv4 | Col 21 | Tecomán | 3 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M3Pv5 | Col 22 | Tecomán | 3 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M3Pv6 | Col 23 | Tecomán | 3 | Vegetativa | No creció |
| Col1S1M4Pv1 | Col 24 | Tecomán | 4 | Vegetativa | No creció |
| Col1S1M4Pv2 | Col 25 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv3 | Col 26 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv4 | Col 27 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv5 | Col 28 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv6 | Col 29 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv7 | Col 30 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M4Pv8 | Col 31 | Tecomán | 4 | Vegetativa | No creció |
| Col1S1M4Pv9 | Col 32 | Tecomán | 4 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv1 | Col 33 | Tecomán | 5 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv2 | Col 34 | Tecomán | 5 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv3 | Col 35 | Tecomán | 5 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv4 | Col 36 | Tecomán | 5 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv5 | Col 37 | Tecomán | 5 | Vegetativa | No creció |
| Col1S1M5Pv6 | Col 38 | Tecomán | 5 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M5Pv7 | Col 39 | Tecomán | 5 | Vegetativa | No creció |
| Col1S1M5Pv8 | Col 40 | Tecomán | 5 | Vegetativa | No inoculado |
| Col1S1M6Pv1 | Col 41 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |

| | | | | | |
|--------------|--------|------------|----|------------|----------------|
| Col1S1M6Pv2 | Col 42 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv3 | Col 43 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv4 | Col 44 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv5 | Col 45 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv6 | Col 46 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv7 | Col 47 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv8 | Col 48 | Tecomán | 6 | Vegetativa | No inoculado |
| Col1S1M6Pv9 | Col 49 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv10 | Col 50 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S1M6Pv11 | Col 51 | Tecomán | 6 | Vegetativa | En cadena |
| Col1S2M7PF1 | Col 52 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF2 | Col 53 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF3 | Col 54 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF4 | Col 55 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF5 | Col 56 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF6 | Col 57 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF7 | Col 58 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF8 | Col 59 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF9 | Col 60 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF10 | Col 61 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF11 | Col 62 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M7PF12 | Col 63 | Manzanillo | 7 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF1 | Col 64 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF2 | Col 65 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF3 | Col 66 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF4 | Col 67 | Manzanillo | 8 | Floral | No inoculado |
| Col1S2M8PF5 | Col 68 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF6 | Col 69 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF7 | Col 70 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF8 | Col 71 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF9 | Col 72 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF10 | Col 73 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF11 | Col 74 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M8PF12 | Col 75 | Manzanillo | 8 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF1 | Col 76 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF 4 | Col 77 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF 5 | Col 78 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF 6 | Col 79 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF8 | Col 80 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col1S2M9PF9 | Col 81 | Manzanillo | 9 | Floral | Falsas cabezas |
| Col2S3M10Pv1 | Col 82 | Colima | 10 | Vegetativa | Contaminante |
| Col2S3M10Pv2 | Col 83 | Colima | 10 | Vegetativa | Contaminante |
| Col2S3M10Pv3 | Col 84 | Colima | 10 | Vegetativa | No inoculado |
| Col2S3M10Pv4 | Col 85 | Colima | 10 | Vegetativa | Contaminante |
| Col2S3M10Pv5 | Col 86 | Colima | 10 | Vegetativa | Contaminante |
| Col2S3M10Pv6 | Col 87 | Colima | 10 | Vegetativa | En cadena |

| | | | | | |
|--------------|---------|------------------|----|------------|----------------|
| Col2S3M11Pv1 | Col 88 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv2 | Col 89 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv3 | Col 90 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv4 | Col 91 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv5 | Col 92 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv6 | Col 93 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M11Pv7 | Col 94 | Colima | 11 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S3M12Pv1 | Col 95 | Colima | 12 | Vegetativa | En cadena |
| Col2S4M12PF2 | Col 96 | Colima | 12 | Floral | Falsas cabezas |
| Col2S4M12PF3 | Col 97 | Colima | 12 | Floral | Falsas cabezas |
| Col2S4M12PF4 | Col 98 | Colima | 12 | Floral | Falsas cabezas |
| Col2S4M12PF5 | Col 99 | Colima | 12 | Floral | Falsas cabezas |
| Col2S5M13Pv1 | Col 100 | Villa de Álvarez | 13 | Vegetativa | Falsas cabezas |
| Col2S5M13Pv3 | Col 101 | Villa de Álvarez | 13 | Vegetativa | Falsas cabezas |
| Col2S5M13Pv4 | Col 102 | Villa de Álvarez | 13 | Vegetativa | No creció |
| Col2S5M13Pv5 | Col 103 | Villa de Álvarez | 13 | Vegetativa | Falsas cabezas |
| Col2S5M13Pv6 | Col 104 | Villa de Álvarez | 13 | Vegetativa | Falsas cabezas |

Anexo IV. Aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejido malformado de mango colectado en el estado de Colima en el año de 2009.

| No. colecta | Municipio | Árbol | Tipo de malformación | No. aislamientos | Presentación de conidios |
|----------------|--|---------------|--|------------------|--------------------------|
| Col. 3 | Predio: La Loma Carretera: Colima-Manzanillo, Tecomán | M1 A8 | Vegetativa | 1 | En cadena |
| | | M1 A8 | Vegetativa | 2 | En cadena |
| | | M1 A8 | Vegetativa | 3 | En cadena |
| | | M1 A8 | Vegetativa | 4 | En cadena |
| | | M3 A15 | Vegetativa | 1 | En cadena |
| | | M3 A15 | Vegetativa | 2 | En cadena |
| | | M3 A15 | Vegetativa | 3 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 1 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 2 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 3 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 4 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 5 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 6 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 7 | En cadena |
| | | M4 A19 | Vegetativa | 8 | En cadena |
| | | M5 A22 | Vegetativa | 1 | En cadena |
| | | M5 A22 | Vegetativa | 2 | En cadena |
| | | Col.3 | Campo experimental INIFAP Tecomán, Lote de variedades y Mutantes de mango. | M1 A 28 | Floral |
| M1 A 28 | Vegetativa | | | 2 | En cadena |
| M1 A 28 | Vegetativa | | | 3 | En cadena |
| M1 A 28 | Vegetativa | | | 4 | En cadena |
| M2 A206 | Vegetativa | | | 1 | En cadena |
| M4 A54 | Vegetativa | | | 1 | En cadena |
| M5 A28 | Vegetativa | | | 1 | En cadena |
| M5 A28 | Vegetativa | | | 2 | En cadena |
| M5 A28 | Vegetativa | | | 3 | En cadena |
| M5 A28 | Vegetativa | | | 4 | En cadena |
| Col.4 | El Quemado Ejido Venustiano Carranza Mpio. de Manzanillo | M1 A12 | Floral | 1 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 2 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 3 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 4 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 5 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 6 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 7 | Falsas cabezas |
| | | M1 A12 | Floral | 8 | Falsas cabezas |
| | | M2 A20 | Floral | 1 | Falsas cabezas |
| | | M2 A20 | Floral | 2 | Falsas cabezas |
| | | M2 A20 | Floral | 3 | Falsas cabezas |
| | | M2 A20 | Floral | 4 | Falsas cabezas |
| | | M2 A20 | Floral | 5 | Falsas cabezas |
| | | M3 A18 | Floral | 1 | Falsas cabezas |
| | | M3 A18 | Floral | 2 | Falsas cabezas |
| | | M3 A18 | Floral | 3 | Falsas cabezas |
| | | M4 A6 | Floral | 1 | Falsas cabezas |
| | | M4 A6 | Floral | 2 | Falsas cabezas |
| | | M4 A6 | Floral | 3 | Falsas cabezas |
| | | M4 A6 | Floral | 4 | Falsas cabezas |
| M4 A6 | Floral | 5 | Falsas cabezas | | |

Anexo V. Posición de los cambios en las bases de secuencias del gen factor de elongación 1- α de aislamientos de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango.

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 33 | 34 | 35 | 39 | 40 | 42 | 43 | 64 | 65 | 70 | 79 |
| NRRL 22902 | T | C | T | C | G | C | A | C | A | C | C |
| NRRL 25226 | T | A | C | T | G | T | G | - | A | T | T |
| Col-52 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-60 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-66 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-75 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-77 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-79 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| CML 283 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| NRRL 25623 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| Col-96 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| Col-98 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| Col-103 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| NRRL 53140 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| NRRL 53143 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| NRRL 53147 | A | A | C | C | G | C | G | - | C | C | T |
| CML262 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| CML345 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |
| CML389 | T | A | C | C | T | C | G | - | T | C | T |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | 80 | 81 | 84 | 92 | 93 | 95 | 96 | 97 | 98 | 102 | 103 |
| NRRL 22902 | C | T | T | T | T | T | C | - | A | T | C |
| NRRL 25226 | C | C | C | A | T | T | C | A | A | A | C |
| Col-52 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-60 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-66 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-75 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-77 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-79 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| CML 283 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| NRRL 25623 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| Col-96 | T | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |
| Col-98 | T | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|---|---|---|----------|----------|----------|
| Col-103 | T | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |
| NRRL | C | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |
| 53140 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |
| 53143 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | T | C | C | T | - | - | - | A | A | T |
| 53147 | | | | | | | | | | | |
| CML262 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| CML345 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |
| CML389 | C | T | C | C | A | - | - | - | C | A | T |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 106 | 109 | 117 | 119 | 121 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 208 |
| NRRL | C | A | C | T | T | C | A | C | T | T | G |
| 22902 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | T | G | A | C | T | C | - | - | - | - | G |
| 25226 | | | | | | | | | | | |
| Col-52 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| Col-60 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| Col-66 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| Col-75 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| Col-77 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| Col-79 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| CML 283 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| NRRL | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| 25623 | | | | | | | | | | | |
| Col-96 | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| Col-98 | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| Col-103 | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| NRRL | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| 53140 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| 53143 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | G | C | C | T | T | A | C | T | T | G |
| 53147 | | | | | | | | | | | |
| CML262 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| CML345 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |
| CML389 | C | G | C | C | C | T | A | C | T | T | A |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 215 | 227 | 234 | 235 | 238 | 244 | 251 | 270 | 307 | 308 | 318 |
| NRRL | C | A | T | C | C | C | T | G | T | - | C |
| 22902 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | T | G | T | T | C | T | C | G | T | T | T |
| 25226 | | | | | | | | | | | |
| Col-52 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Col-60 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| Col-66 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| Col-75 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| Col-77 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| Col-79 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| CML 283 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| NRRL | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| 25623 | | | | | | | | | | | |
| Col-96 | C | A | C | T | A | C | C | A | T | - | T |
| Col-98 | C | A | C | T | A | C | C | A | T | - | T |
| Col-103 | C | A | C | T | A | C | C | A | T | - | T |
| NRRL | C | A | C | T | A | C | C | A | - | - | T |
| 53140 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | A | C | T | A | C | C | A | - | - | T |
| 53143 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | A | C | T | A | C | C | A | - | - | T |
| 53147 | | | | | | | | | | | |
| CML262 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| CML345 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |
| CML389 | C | A | C | T | A | C | C | G | - | - | T |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|----------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 332 | 339 | 340 | 341 | 343 | 345 | 346 | 348 | 355 | 357 | 358 |
| NRRL | T | C | G | G | A | C | G | T | - | T | A |
| 22902 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | T | G | G | C | C | G | T | - | - | - |
| 25226 | | | | | | | | | | | |
| Col-52 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| Col-60 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| Col-66 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| Col-75 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| Col-77 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| Col-79 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| CML 283 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| NRRL | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| 25623 | | | | | | | | | | | |
| Col-96 | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| Col-98 | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| Col-103 | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| NRRL | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| 53140 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| 53143 | | | | | | | | | | | |
| NRRL | C | C | - | C | C | T | T | C | T | - | - |
| 53147 | | | | | | | | | | | |
| CML262 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| CML345 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |
| CML389 | C | T | G | C | C | T | T | C | - | - | - |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 375 | 376 | 377 |
| NRRL 22902 | A | C | C | A | T | T | C | T | C | A | A |
| NRRL 25226 | - | - | - | - | - | - | T | C | C | A | A |
| Col-52 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-60 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-66 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-75 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-77 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-79 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| CML 283 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| NRRL 25623 | - | - | C | A | T | T | T | T | T | C | - |
| Col-96 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| Col-98 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| Col-103 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| NRRL 53140 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| NRRL 53143 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| NRRL 53147 | - | - | C | A | T | T | T | C | T | C | - |
| CML262 | - | - | C | A | T | T | T | T | G | C | - |
| CML345 | - | - | C | A | T | T | T | T | G | C | - |
| CML389 | - | - | C | A | T | T | T | T | G | C | - |

Continuación anexo V

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 382 | 385 | 397 | 414 | 415 | 417 | 582 | 584 | 585 | 590 | 592 |
| NRRL 22902 | T | G | C | T | T | A | T | C | A | A | T |
| NRRL 25226 | C | A | C | T | C | G | T | C | A | T | T |
| Col-52 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-60 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-66 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-75 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-77 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-79 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| CML 283 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| NRRL 25623 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-96 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-98 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |
| Col-103 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |

U.M.S.N.H

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NRRL 53140 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |
| NRRL 53143 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |
| NRRL 53147 | C | A | T | T | T | G | C | C | G | C | C |
| CML262 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |
| CML345 | C | A | C | C | T | G | C | T | G | C | C |
| CML389 | C | A | C | C | T | G | C | C | G | C | C |

Anexo VI. Posición de los cambios en las bases de secuencias del gen β -tubulina de aislamientos de *Fusarium* asociados a tejido malformado de mango.

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | 23 | 24 | 25 | 41 | 42 | 61 | 64 | 68 | 70 | 105 | 117 |
| NRRL 22902 | C | C | A | C | - | C | C | A | A | G | C |
| NRRL 25226 | A | C | C | C | G | T | C | A | G | G | C |
| Col-52 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-60 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-66 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-75 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-77 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-79 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| CML 283 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| NRRL 25623 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| Col-96 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| Col-98 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| Col-103 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| NRRL 53140 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| NRRL 53143 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| NRRL 53147 | A | T | A | T | G | T | G | G | G | G | T |
| CML262 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | A | C |
| CML345 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |
| CML389 | A | T | A | T | G | T | C | G | G | G | C |

Continuación anexo VI

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 120 | 131 | 133 | 14 5 | 147 | 168 | 213 | 258 | 285 | 286 | 304 |
| NRRL 22902 | A | C | G | A | T | C | C | C | T | A | G |
| NRRL 25226 | A | C | G | A | C | T | C | C | C | C | T |
| Col-52 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-60 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-66 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-75 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-77 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-79 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| CML 283 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| NRRL 25623 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | A | G |
| Col-96 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |
| Col-98 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |
| Col-103 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |

U.M.S.N.H

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|----------|---|---|----------|----------|
| NRRL 53140 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |
| NRRL 53143 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |
| NRRL 53147 | G | T | A | G | T | T | T | T | C | A | G |
| CML262 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | T | A |
| CML345 | G | T | A | G | T | T | C | T | C | T | G |
| CML389 | G | T | A | | T | T | C | T | C | T | G |

Continuación anexo VI

| Aislamiento | Posición de bases | | | | | | |
|-----------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|
| | 308 | 310 | 318 | 32 | 382 | 394 | 400 |
| | | | | 0 | | | |
| NRRL 22902 | T | C | - | C | T | C | T |
| NRRL 25226 | C | C | - | C | T | T | T |
| Col-52 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-60 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-66 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-75 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-77 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-79 | T | C | - | C | T | C | A |
| CML 283 | T | C | - | C | C | C | A |
| NRRL 25623 | T | C | - | C | C | C | A |
| Col-96 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-98 | T | C | - | C | T | C | A |
| Col-103 | T | C | - | C | T | C | A |
| NRRL 53140 | T | C | - | C | T | C | A |
| NRRL 53143 | T | C | - | C | T | C | A |
| NRRL 53147 | T | C | - | C | T | C | A |
| CML262 | T | C | - | C | T | C | A |
| CML345 | T | T | T | T | T | C | A |
| CML389 | T | C | - | C | T | C | A |