



TIZÓN SUIZO (*Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak) EN *Pseudotsuga menziessi* var. *glauca* (Beissn.) Mayr

SWISS NEEDLE CAST (*Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak) IN *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr

David Cibrián Tovar¹, Omar Alejandro Pérez-Vera¹, Silvia Edith García Díaz¹, Víctor David Cibrián Llanderal², Juan Cruz Juárez¹ y Gabriela Hernández Acevedo¹

RESUMEN

En México se localizan poblaciones nativas de *Phaeocryptopus gaeumannii* como colonizadoras de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*. Este hongo es causante del tizón suizo (*Swiss Needle Cast*), enfermedad que causa defoliación prematura y reducción en el crecimiento. *P. gaeumannii* se distribuye en el bosque natural de la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental y en la Sierra Madre del Sur, así como en diversas plantaciones de Árboles de Navidad del centro del país. Los objetivos del presente trabajo fueron identificar y caracterizar molecularmente al patógeno en distintas áreas geográficas y esclarecer algunos aspectos de su ciclo biológico. Para ello, se recolectó follaje de *P. menziesii* var. *glauca* con pseudotecios maduros en ocho estados de la república mexicana y se obtuvo una muestra procedente de Oregon (Estados Unidos de América); se aislaron en agar - agua 1.5 % (AA) y se mantuvieron en un medio de cultivo de papa - dextrosa - agar (PDA) durante 60 días. Para identificarlas se consideraron características morfológicas así como los resultados de la amplificación de genes nucleares, a través de la PCR - ITS, que presentó de 99 a 100 % de identidad. El crecimiento se dio de forma radial, color verde olivo a gris, sin formar estructuras reproductivas. Las ascosporas alcanzaron su madurez en marzo y son detectables en la atmósfera; la dispersión principal ocurre entre junio y julio, en relación con las condiciones climáticas y de la localidad; en septiembre y octubre disminuye la cantidad.

Palabras clave: Árboles de Navidad, captura de esporas, PCR, plantación comercial, *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak, pseudotecio.

ABSTRACT

There are native populations of *Phaeocryptopus gaeumannii* in Mexico as colonizing species of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*. This fungus is the cause of the Swiss Needle Cast, a disease that provokes premature defoliation and a reduction in growth. The aims of this paper were to identify and describe molecularly this pathogen in different geographical areas and to clear up some details of its biological cycle. Therefore, *P. menziesii* var. *glauca* leaves with ripe pseudothecia were collected in eight states of the country and a sample from Oregon (United States of America) was taken; they were isolated in 1.5 % water-agar (WA) and were kept in a potatoe - dextrose - agar (PDA) cultivation media for 60 days. To identify them, morphological features were considered as well as the results of the nuclear gene amplification, through the ITS - PCR which showed 99 to 100 % of identity. Growth was radial, olive green to grey color, without formation of reproductive structures. *P. gaeumannii* is found in the natural forests of Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Sierra Madre del Sur, as in several Christmas tree plantations at central Mexico. Ascospores became ripe in March and are visible in the atmosphere; the main dispersion occurs from June and July; in regard to the climate and the locality; in September and October they diminish their amount.

Key words: Christmas trees, spore catchment, PCR, commercial plantation, *Phaeocryptopus gaeumannii* (Rhode) Petrak, pseudothecius.

Fecha de recepción/date of receipt: 3 de abril de 2013; Fecha de aceptación/date of acceptance: 20 de febrero de 2014.

¹ División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Correo-e: oalejandrovera@gmail.com

² Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

INTRODUCCIÓN

Pseudotsuga menziesii var. *glauca* (Beissn.) Mayr habita en Canadá, Estados Unidos de América y México; en el último se conoce como pinabete o romero y se distribuye en la Sierra Madre Oriental, en la Sierra Madre Occidental (Martínez, 1963; Rzedowski, 1994) y en la Sierra Madre del Sur, de manera discontinua y en altitudes de 2 000 a 3 200 m (Debreczy y Rácz, 1995). La especie se cultiva para comercializarla como Árbol de Navidad en 14 estados, que en total, suman una superficie de 1 750 ha (Conafor, 2009).

Phaeocryptopus gaeumannii (Rhode) Petrak (tizón suizo) infecta individuos de diferentes edades en las plantaciones ubicadas en el centro del país (Cibrián *et al.*, 2007); los huéspedes muestran clorosis, defoliación prematura del follaje y reducción en el crecimiento. En Estados Unidos de América y Canadá afecta grandes regiones del noroeste y daña principalmente a *P. menziesii* (Mirb.) Franco. Su primer registro data de 1920, en Suiza; después se le identificó en Norteamérica, en donde se le conoce como *Rocky Mountain Douglas Fir* o *Swiss Needle Cast* (SNC) (Hansen *et al.*, 2000; Winton *et al.*, 2007). *Phaeocryptopus* pertenece a la familia Venturiaceae, orden Pleosporales y a *Rhizosphaera*, como su anamorpho (Kirk *et al.*, 2001); sin embargo, estudios moleculares recientes han clasificado a *P. gaeumannii* en la familia Mycosphaerellaceae, orden Capnodiales, con las especies *Mycosphaerella* y *Rasutoria* (Morales *et al.*, 2012; Winton *et al.*, 2007).

En la actualidad el hongo se ha expandido hacia Argentina, Chile, Nueva Zelanda, Turquía y algunos países de Europa, por lo que constituye un problema fitosanitario en los cultivos de árboles de Navidad (Osorio, 2007; Morales *et al.*, 2012). En la zona costera de Oregon existen infecciones en aproximadamente 15 000 ha, lo que significa una merma en el desarrollo de hasta 50 % (Stone *et al.*, 2007). En México, Cibrián *et al.* (2007) consignaron los primeros datos acerca de los daños y su ubicación. El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar molecularmente la especie en diferentes áreas geográficas y esclarecer algunos aspectos de su ciclo biológico en plantaciones comerciales del centro del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se obtuvieron muestras de follaje de *P. menziesii* var. *glauca* con síntomas de tizón suizo tanto en bosque natural como en zona cultivada, entre junio y diciembre de 2007: cuatro correspondieron al estado de Coahuila, seis a Durango, tres al Estado de México y una a Querétaro. De enero a diciembre de 2008 se recolectó en bosque natural, para añadir ocho colecciones de Chihuahua, cinco de Nuevo León, tres de

INTRODUCTION

Pseudotsuga menziesii var. *glauca* (Beissn.) Mayr lives in Canada, United States of America and Mexico; in the latter, it is known as "pinabete" or "romero" and is distributed in Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental (Martínez, 1963; Rzedowski, 1994) and Sierra Madre del Sur in a discontinuous way at altitudes between 2 000 and 3 200 m (Debreczy and Rácz, 1995). The species is produced to be commercialized as Christmas Tree in 14 states, which, as a whole, sum 1 750 ha (Conafor, 2009).

Phaeocryptopus gaeumannii (Rhode) Petrak (Swiss Needle Cast) infects individuals of different ages in the plantations located at the center of the country (Cibrián *et al.*, 2007); hosts show chlorosis, premature defoliation and growth reduction. In the United States and Canada it affects extensive regions at the northeast and harms, mainly, *P. menziesii* (Mirb.) Franco. Its first record is from 1920 in Switzerland; afterwards, it was found in North America, where it is known as *Rocky Mountain Douglas Fir* or *Swiss Needle Cast* (SNC) (Hansen *et al.*, 2000; Winton *et al.*, 2007). *Phaeocryptopus* belongs to the Venturiaceae family, Pleosporales order and to *Rhizosphaera*, as its anamorph (Kirk *et al.*, 2001); however, recent molecular studies *P. gaeumannii* has been classified in the Mycosphaerellaceae family, Capnodiales order, with the *Mycosphaerella* and *Rasutoria* species (Morales *et al.*, 2012; Winton *et al.*, 2007).

At present this fungus has spread out to Argentina, Chile, New Zealand, Turkey and other European countries, and so it has become a phytosanitary problem in the cultivation of Christmas trees (Osorio, 2007; Morales *et al.*, 2012). In the coast of Oregon there are infections in about 15 000 ha, which means a loss in the development about 50 % (Stone *et al.*, 2007). In Mexico, Cibrián *et al.* (2007) recorded the first data about damages and their location. The aim of this study was to identify and describe molecularly the species in different geographic areas and to clarify some aspects of their biologic cycle in commercial plantations of the center of the country.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Samples of *P. menziesii* var. *glauca* foliage with Swiss Needle Cast symptoms were taken from natural forest and cultivation zones, between June and December, 2007: four came from Coahuila state, six from Durango, three from Mexico State and one from Querétaro. From January to December, 2008, material was collected in a natural forest, to add eight collections from Chihuahua, five from Nuevo León, three from Oaxaca and one from Puebla (Table 1, Figure 1) and a last one with pseudothecia of a tree of the focus species and with the same characteristics, imported from Oregon, USA.

Oaxaca y una de Puebla (Cuadro 1, Figura 1) y se recibió una última, con pseudotecios de un árbol de la especie de interés y con las mismas características, importado de Oregon, EUA.

Aislamiento e identificación

Los especímenes de acículas con pseudotecios se lavaron con agua destilada estéril durante 5 minutos, se secaron y se adhirieron por el haz a la tapa de la caja de Petri; se dejaron expuestos los cuerpos fructíferos hacia el medio de cultivo de agar - agua (AA) y fueron incubados a 25 °C con luz blanca por 2 días. Pasado este tiempo, se aislaron las ascosporas germinadas de forma individual en papa - dextrosa - agar (PDA) y se mantuvieron ahí por 60 días. Se registró el crecimiento micelial, la formación de estructuras reproductivas y la pigmentación de las colonias en cajas de Petri con PDA.

Isolation and identification

The specimens of needleleaves with pseudothecia were washed with sterile distilled water for 5 minutes; they were dried and were adhered by the upper surface to the lid of the Petri box; they were left to the exposed fruiting bodies towards the middle of the water-agar (WA) culture and were incubated at 25 °C with white light for 2 days. After that time, they were the germinated ascospores were individually isolated in potatoe - dextrose - agar (PDA) and so were kept for 60 days. The mycelial growth, reproductive structure formation and colony pigmentation in Petri boxes with PDA were recorded.

Cross-cuttings were manually made and the morphological characteristics were observed in 100 pseudothecia, 50 ascae and 50 ascospores with a Carl Zeiss Micro Imaging GmbH

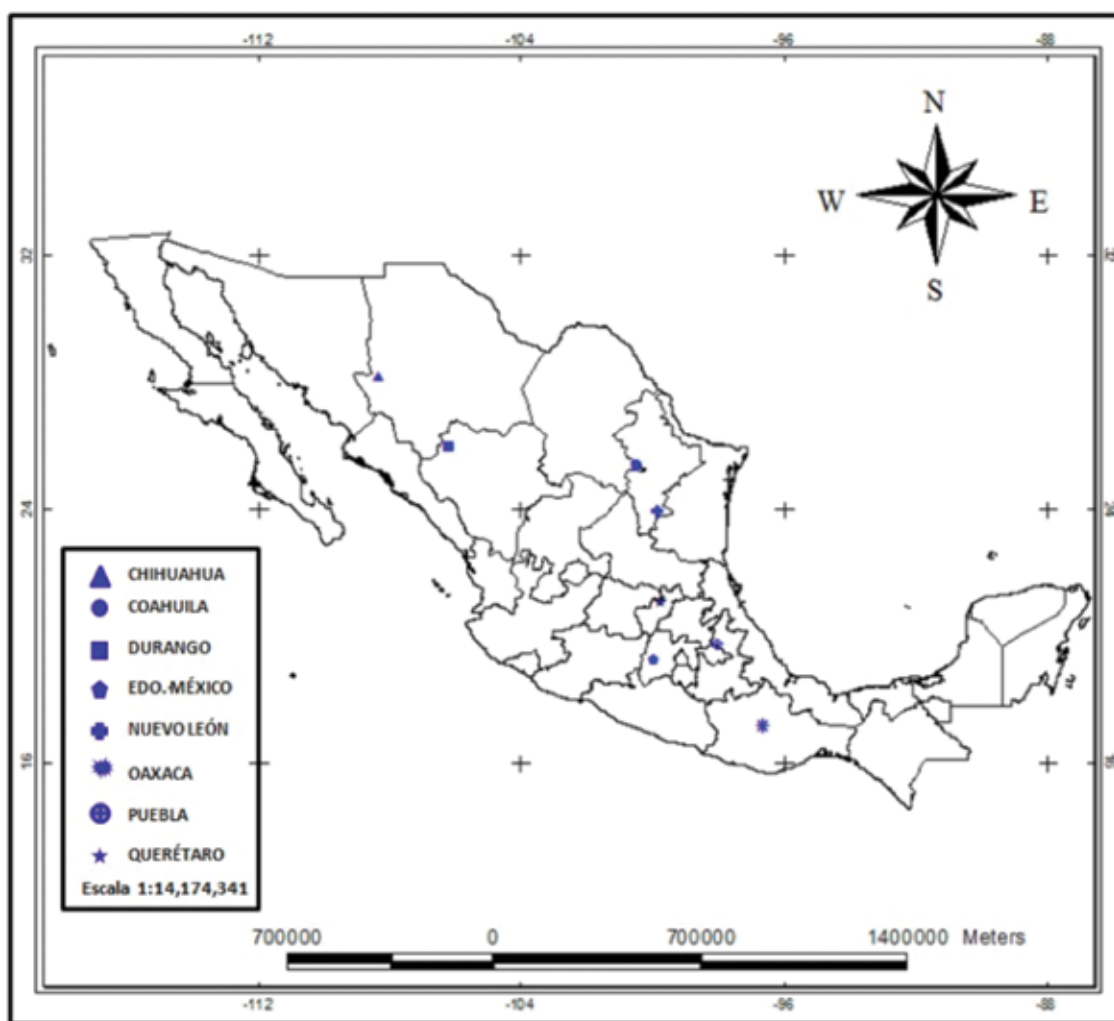


Figura 1. Distribución en México de *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petra), que infecta individuos de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr.

Figure 1. *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petra) distribution in México that infects individuals of *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr.

Se realizaron cortes transversales de forma manual y se observaron las características morfológicas de 100 pseudotecios, 50 ascas y 50 ascoporas con un microscopio compuesto Carl Zeiss Microimaging GmbH. Con las claves taxonómicas de Stone y Carroll (1985), Stone *et al.* (2008a) y Osorio (2007) se identificaron el género y la especie. Para analizar el desarrollo del hongo en la parte interna y sobre la superficie de las hojas se utilizó microscopía electrónica de barrido, que permitió revisar secciones de tejido con cuerpos fructíferos de 1 mm de longitud, que se fijaron en glutaraldehído al 3 % y se lavaron con amortiguador de fosfatos Sorensen's, para ser deshidratados en una serie de soluciones de etanol y secados en CO₂ a punto crítico en un desecador Samdri - 780A®; finalmente se recubrieron con oro en una ionizadora JFC - 1100® y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM - 35C® en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados de Montecillo, Estado de México.

Caracterización molecular

El ADN de los hongos se obtuvo a partir de cultivos de punta de hifa que crecieron en medio líquido de extracto malta (EM), con el método AP (Sambrook y Russell, 2001). Los aislamientos utilizados y la localidad del origen se indican en el Cuadro 1.

Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en combinación con los iniciadores ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (White *et al.*, 1990) para amplificar las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (ARNr). El producto amplificado se purificó con el *Kit Wizard SV* (Promega®, USA) y se secuenció en ambas direcciones en MacroGen (Corea). Cada secuencia se analizó con el Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) y se depositó en el *GenBank*.

Ciclo biológico y trapeo de ascoporas

Se realizaron visitas mensuales durante 24 meses (de 2006 a 2009) en las que se registró el desarrollo de la enfermedad causada por *P. gaeumannii* en plantaciones comerciales de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* en dos sitios: Tres Encinos (19° 11'34.92" N y 100°07' 50.51" O) a 1 822 msnm (Valle de Bravo, Estado de México) y en el Rancho Chichicaxtla (19°43' 50" N y 97° 59' 17" O) a 2 852 msnm (área semillera en Aquixtla, Puebla).

compound microscope. The taxonomic keys of Stone and Carroll (1985), Stone *et al.* (2008a) and Osorio (2007) were used to identify the genus and species. Electronic microscopy was used to analyze the development of the fungus in its internal part and on the surface of the leaves; it made it possible to review tissue sections with fruiting bodies 1 mm long, that were fixed in 3 % glutaraldehyde and were rinsed with a Sorensen's phosphate buffer, to be dehydrated in a series of ethanol solutions and dried in CO₂ critical point in a Samdri - 780A® dryer; finally, they were covered with gold with a JFC - 1100® ionizer and were observed in a JSM - 35C® electron microscope at the Electron Microscope Laboratory of Colegio de Postgraduados de Montecillo, Estado de México.

Molecular description

The DNA of the fungi was obtained from cultures of the end hypha that grew in a liquid media of malt extract (ME), with the AP method (Sambrook and Russell, 2001). The isolations that were used and the location of origin are in Table 1. The polymerase chain reaction (PCR) was combined with the ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) initiators (White *et al.*, 1990) to amplify the ITS1 and ITS2 regions of the ribosomal genes (ARNr). The amplified product was purified by the *Kit Wizard SV* (Promega®, USA) and was sequenced in both directions in MacroGen (Corea). Each sequence was analyzed with BioEdit v7.0.9.1 Software (Hall, 1999) and was deposited in the *GenBank*.

Biological life cycle and ascospore trapping

Monthly visits were carried out for 24 months (2006 - 2009) in which a record of the evolution of the disease caused by *P. gaeumannii* in commercial plantations of *P. menziesii* var. *glauca* in two sites was made: Tres Encinos (19° 11'34.92" N and 100°07' 50.51" O) a 1 822 masl (Valle de Bravo, Estado de México) and in Rancho Chichicaxtla (19°43'50" N and 97°59'17" O) at 2 852 masl (seeding area in Aquixtla, Puebla).

Additionally, the ascospore dispersion period was determined by using "fungal spores traps" (Ostrey and Nicholls, 1982) consisting of covering with pure petrolatum (vaseline) the face of a slide divided into five bands of 250 mm², for a total of 1 250 mm²; they were placed at a height of 30 to 50 cm from the floor and 20 cm into the foliage of *P. menziesii* var. *glauca*. Two areas were determined to put them in; in the first, 104 were placed (March 10th to September 8th, 2006) and in the second, 81 (April 7th to October 10th, 2009); every 16 days they were changed and were deposited in preparations boxes for counting spores in the laboratory of Forest Pathology, of the Forest Science Division (DICIFO) de la Universidad Autónoma Chapingo, where they were examined under a Leica (I. GCE Model) compound microscope with a 40X objective.



Cuadro 1. Sitios con *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr infectado por *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak).
 Table 1. Sites with *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr infected by *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak).

Estado	Municipio	Aislamiento ⁵	Localización
			Latitud/Longitud
Chihuahua ¹	Ocampo	1CCC ⁴	N28°11'47.20"/W108°19'19.70"
	Guadalupe y Calvo	2CEC	N26°12'38.27"/W106°33'25.49"
		3CEC ⁴	
Coahuila ¹	Ocampo		N28°20'41.78"/W107°59'54.52"
	Arteaga	5CL ⁴	N25°22'43.70"/W100°30'54.20"
		6CSR	N25°21'35.50"/W100°28'39.30"
		7CSAA	N25°14'02.83"/W100°26'21.03"
		8DPP ⁴	N25°58'18.20"/W106°07'18.20"
Durango ¹	Guanaceví	9DAC	N25°58'44.60"/W106°08'23.70"
		10DEO	N26°00'47.10"/W106°13'04.10"
		11DECV	N25°58'44.60"/W106°08'23.70"
		12DEP ⁴	N26°16'08.85"/W106°23'42.39"
		13DEC	N26°12'42.20"/W106°22'48.50"
Estado de México ²	Valle de Bravo	14EMAB ⁴	N19°16'10.80"/W99°56'32.68"
	Amanalco	15EMAJ	N19°15'37.84"/W99°56'14.92"
		16EMEZ ⁴	
		17NLEP ⁴	N24°53'38.30"/W100°12'55.90"
Nuevo León ¹	Zaragoza	18NLCP ⁴	N24°53'07.20"/W100°13'11.40"
		19NLE	N23°54'02.30"/W99°47'53.70"
		20NLEZ	N23°55'06.60"/W99°48'10.50"
		21NLEZ ⁴	
Oaxaca ²	Ixtepeji	23OLC ⁴	N17°10'50.60"/W96°36'17.20"
24OLC			
Oaxaca ¹		25OLP	
Puebla ²	Aquixtla	26PLJC ⁴	N19°43'50.78"/W97°59'17.80"
Querétaro ¹	Pinal de Amoles	27QLP ⁴	N 21°09'31.50"/W 99°41'28.14"
Oregon ³	Oregon	30ORE ⁴	⁶

¹ = Bosque natural; ² = Plantación comercial; ³ = Árbol de Navidad importado a México y revisado en la Central de Abasto de la Ciudad de México; ⁴ = Aislamientos utilizados para PCR; ⁵ = Número de aislamientos por estado. ⁶ = Sin datos.

¹ = Natural forest; ² = Commercial plantation; ³ = Christmas tree imported to Mexico and reviewed at the Central de Abasto market of Mexico City; ⁴ = Isolations used for PCR; ⁵ = Number of isolations by state; ⁶ = Without data.

Adicionalmente, se determinó el periodo de dispersión de las ascosporas con ayuda de "trampas de esporas fungales" (Ostrey y Nicholls, 1982) que consisten en cubrir con petrolato puro (vaselina) la cara de un portaobjetos dividido en cinco bandas de 250 mm², para obtener un total de 1 250 mm²; se colocaron a una altura de 30 a 50 cm del suelo y 20 cm hacia el interior



del follaje de *P. menziesii* var. *glauca*. Se determinaron dos áreas para colocarlas, en la primera se pusieron 104 (10 de marzo al 8 de septiembre de 2006) y en la segunda, 81 (7 de abril al 10 octubre de 2009); cada 16 días se cambiaron y se depositaron en cajas de preparaciones para realizar el conteo de esporas en el laboratorio de Patología Forestal de la División de Ciencias Forestales (DICFO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en donde se examinaron bajo un microscopio compuesto Leica (Mod. CME) con objetivo 40X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos

En total se obtuvieron 27 aislamientos de *P. gaeumannii* del follaje de *P. menziesii* var. *glauca* (Cuadro 1). El hongo se localizó en áreas de distribución natural del género *Pseudotsuga* a lo largo de los tres sistemas montañosos de México: la Sierra Madre Occidental (Chihuahua y Durango), la Sierra Madre Oriental (Nuevo León, Puebla y Querétaro) y en la Sierra Madre del Sur (Oaxaca) (Figura 1).

Síntomas para la identificación del hongo

En *P. menziesii* var. *glauca*, el hongo provoca la caída prematura de brotes jóvenes y acículas de 1 a 3 años de edad, por lo general, antes de que cambien de color; los árboles infectados se caracterizan por tener poco follaje y si la enfermedad es severa puede presentar coloración verde amarillenta, amarillenta, verde violácea o café rojiza, además de que su crecimiento se reduce hasta en 50 % (Figura 2 A). El periodo de vida de las acículas de *P. menziesii* var. *glauca* es de 7 años; sin embargo, cuando hay ataques frecuentes suelen persistir 5 años y en infestaciones severas solo permanecen las del último periodo vegetativo (Morales *et al.*, 2012). En cualquiera de ellas se observan pseudotecios en diferentes etapas (Łakomy e Iwańczuk, 2010).

Los resultados de la microscopía, tanto de luz como electrónica de barrido, indicaron la formación de pequeñas estructuras globosas de color negro en el envés de las acículas, ordenadas en línea sobre los estomas, de los cuales emergen (Figura 2 B y C). El hongo crece y se desarrolla en la cámara subestomática y llega al exterior para formar un pseudotecio (Figura 2 D y E) que impide el intercambio de gases y la transpiración; el micelio en el tejido parenquimatoso provoca disminución de la fotosíntesis y por lo tanto, la caída prematura de las acículas (Manter *et al.*, 2000). Los pseudotecios son negros de (44-) 65 (-96) μm de diámetro, en la base el micelio es de color café claro y se distribuye sobre la superficie; además, se interconecta con otros, lo que confirma las observaciones de Stone *et al.* (2008a) quienes registran anastomosis en el envés del follaje (Figura 2 D). Las ascas son hialinas, de ovoides a piriformes

RESULTS AND DISCUSSION

Isolations

Twenty seven isolations of *P. gaeumannii* from the foliage of *P. menziesii* var. *glauca* were the total number (Table).

The fungi was found in areas of natural distribution of the *Pseudotsuga* genus along the three main mountain systems of Mexico: the Sierra Madre Occidental (Chihuahua and Durango), the Sierra Madre Oriental (Nuevo León, Puebla and Querétaro) and the Sierra Madre del Sur (Oaxaca) (Figure 1).

Symptoms for the identification of the fungus

In *P. menziesii* var. *glauca*, the fungus provokes the premature fall of young shoots and the shedding of 1 to 3 year old needles, usually before they change their color; infected trees have few foliage and if the disease is severe, they may show a yellow green color, or yellow, violet green or brown red and even a 50 % growth reduction (Figure 2A). The life period of the needles of *P. menziesii* var. *glauca* is 7 years; however, if there are frequent attacks, they persist for 5 years, and under severe infestations, they only stay alive for the last vegetative period (Morales *et al.*, 2012). In any of them, different stages of pseudothecia can be observed (Łakomy and Iwańczuk, 2010).

The results of microscopy, both light and electron, revealed the formation of black small globose structures on the lower surface of the needles, on a line over the stomata, from which they emerge (Figure 2B and C). The fungus grows and develops in the substomatic chamber and gets to the exterior to form a pseudothecium (Figures 2D and E), which blocks gas interchange and transpiration; the mycelium in the parenchymatous tissue causes a reduction of photosynthesis and thus, the premature fall of needles (Manter *et al.*, 2000). Pseudothecia are black, (44-) 65 (-96) μm in diameter; mycelium is light brown color at the base and is displayed over the surface; also, it interconnects with others, which confirms what Stone *et al.* (2008a) observed, as they registered anastomosis in the lower surface of the foliage (Figure 2D). Asci are hyaline, from ovoid to pyriform with eight ascospores (Figure 2F), hyaline and bicelular, (9-) 10.5 (-12) x (3-) 4 (-5) μm , with obtuse ends of the apex and a light constriction by a sept; 1 to 2 germination tubes (Figure 2G and H), in which one of the cells is slightly wider and becomes narrower as it nears the base (Osorio, 2007).

P. gaeumannii grows in 2 % PDA, at 24 ± 2 °C and permanent white light. After 30 days, the colony measured 15 mm in diameter and dark olive green to light grey color, whitish at the center and with an olive green halo (Figure 2 I). After 60 days of cultivation, the diameter was 35 mm, with a rough surface and black color at the lower side of the box, as well as

con ocho ascosporas (Figura 2 F), hialinas y bicelulares de (9-) 10.5 (-12) x (3-) 4 (-5) μm , con extremos obtusos en los ápices y una ligera constricción por un septo; presencia de 1 a 2 tubos germinativos (Figura 2 G y H), en los cuales una de las células es ligeramente más ancha y disminuye en tamaño hacia la base (Osorio, 2007).

P. gaeumannii crece en PDA al 2%, a 24 ± 2 °C y luz blanca constante. A los 30 días, la colonia registró 15 mm de diámetro y color verde olivo oscuro a gris claro, blanquecino en el centro y con un halo verde olivo (Figura 2 I). A los 60 días de cultivo el diámetro era de 35 mm, superficie corrugada y color negro en el reverso de la caja, así como ausencia de estructuras reproductivas. Kirk *et al.* (2001) no consideraron ningún anamorfo para *P. gaeumannii*; sin embargo, Stone y Carroll (1985) observaron células elongadas similares a filídes con conidios que provienen de los estomas y lo identificaron como un anamorfo para este hongo. Morales *et al.* (2012) citan que distintos aislamientos de un mismo sitio pueden tener diferencias tanto morfológicas, como en su patrón de coloración, por lo que sugieren realizar estudios moleculares y de patogenicidad para determinar la diversidad poblacional.

Caracterización molecular

La banda de producto de PCR con los primeros ITS4 y ITS5 fue de 550 pb (pares de bases), aproximadamente. Los aislamientos ICC, 3CEC, 5CL, 8DPP, 12DEP, 14EMAB, 16EMEZ, 17NLEP, 21NLEZ, 23OLC, 26PLJC, 27QLP, 30ORE (números de acceso GenBank JN408839, JN408840, JN408841, JN408842, JN408843, JN408844, JN408845, JN408846, JN408847, JN408848, JN408849, JN408850, JN408851) correspondieron a *P. gaeumannii* con 99 a 100 % de similitud, respecto a las secuencias de GenBank.

Ciclo biológico y trapeo de ascosporas

Hay un solo periodo de liberación de ascosporas en el año, lo que significa que el ciclo biológico de *P. gaeumannii* comprende 12 meses y coincide con lo constatado por Stone *et al.* (2008a). El ciclo inicia con la liberación de ascosporas durante primavera y verano, continúa con la infección de nuevas acículas y el desarrollo asintomático del micelio en el interior de estas durante la parte final del verano, otoño y parte del invierno; lo que depende de las condiciones climáticas. Los nuevos pseudotecios se detectan desde noviembre, aunque la mayoría se reconocerán hasta febrero, marzo y abril, meses en el que los cuerpos fructíferos ya están maduros.

La liberación de ascosporas en el sitio Tres Encinos inicia a finales de marzo, pero la dispersión, como tal, ocurre entre la tercera semana de mayo y la segunda de julio, de forma que coincide con el periodo de lluvias y una temperatura promedio de 13 °C (Figura 3 A). Durante 2008 en el área semillera este parámetro

the absence of reproductive structures. Kirk *et al.* (2001) did not consider any anamorph for *P. gaeumannii*; however, Stone and Carroll (1985) observed elongated cells similar to phialides with conidia that comes from the stomata and were identified as an anamorph for this fungus. Morales *et al.* (2012) quote that different isolations of one same site may have differences either morphological, or in the color pattern: therefore, it is suggested that molecular studies as well as of pathogenicity to determine population diversity.

Molecular description

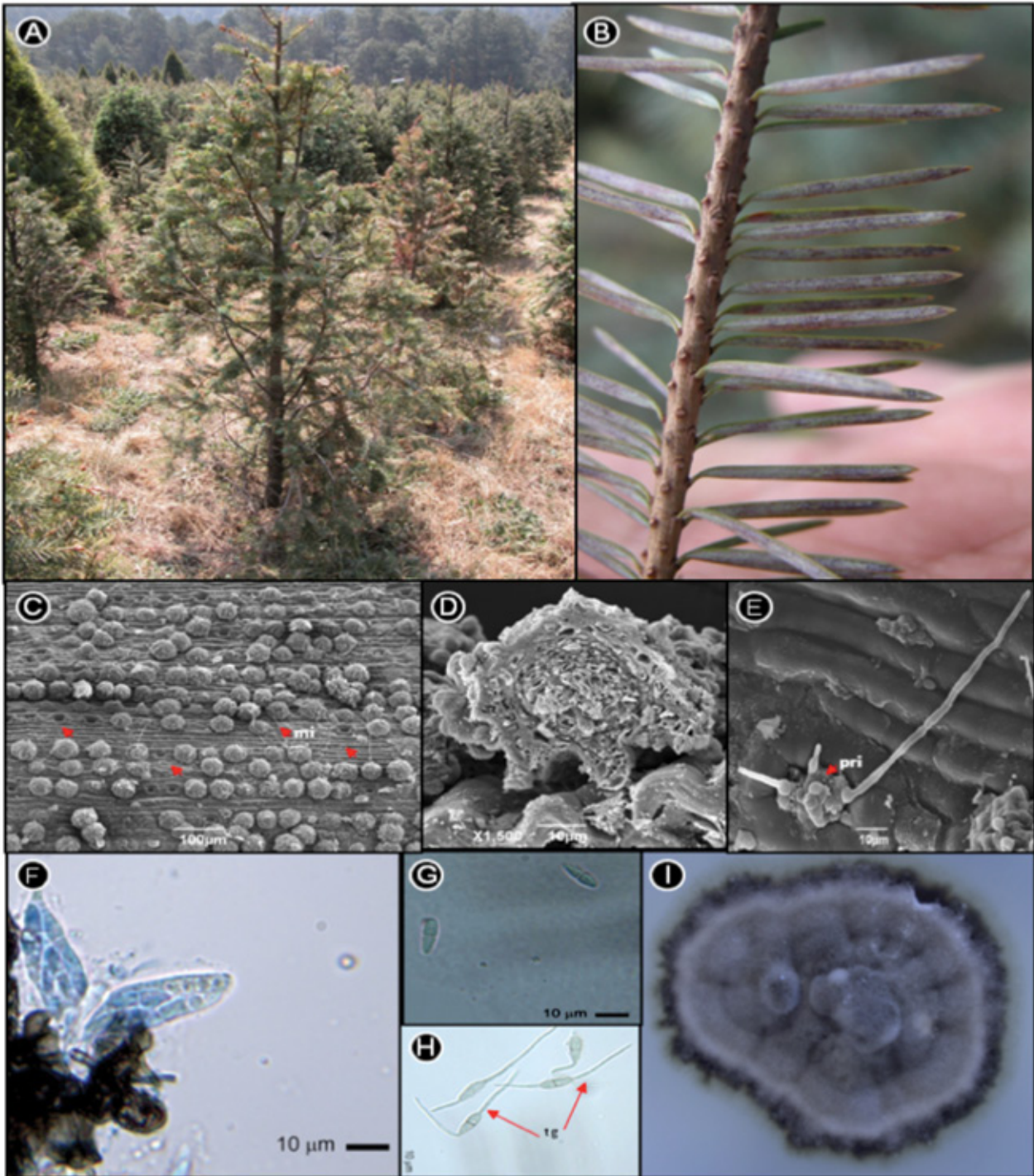
The band of the product of PCR with the first ITS4 and ITS5 was about 550 bp (base pairs). The ICC, 3CEC, 5CL, 8DPP, 12DEP, 14EMAB, 16EMEZ, 17NLEP, 21NLEZ, 23OLC, 26PLJC, 27QLP, 30ORE (access numbers to the GenBank JN408839, JN408840, JN408841, JN408842, JN408843, JN408844, JN408845, JN408846, JN408847, JN408848, JN408849, JN408850, JN408851) isolations belonged to *P. gaeumannii* with a 99 to 100 % of similitude, in regard to the sequences of the GenBank.

Biological life cycle and ascospore trapping

There is only one ascospore release period in the year, which means that the life cycle of *P. gaeumannii* comprises 12 months and coincides with what was found by Stone *et al.* (2008a). The cycle begins with the release of ascospores in the spring and summer, continues with the infection of new needles and asymptomatic mycelial development within this during the late summer, fall and part of winter; it depends on the weather. New pseudothecia are detected since November, although most will be recognized until February, March and April, months in which fruiting bodies are ripe.

The release of ascospores on site *Tres Encinos* begins in late March, but the dispersion, as such, occurs between the third week of May and the second in July, so that it coincides with the period of rain and an average temperature of 13 °C (Figure 3A). During 2008 in the seed area this parameter was recorded from May to August with an average of 17 °C (Figure 3B); in both places the greater dispersion of ascospores occurred between June and July.

In spring and summer infections caused by *P. gaeumannii* depend on moisture conditions, time consistent with shoot emergence and elongation of young buds, which coincides with that published by Stone *et al.* (2008b), who documented that environmental conditions are essential factors for the release of ascospores in the Oregon Coast is made; Michael and Chastagner (1984) reported that in Washington, begins in April and lasts until September with maximum dispersion between June and July. The spread is 10 times higher in foliage with



A)= Plantación comercial de *P. menziesii* var. *glauca* infectada por *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak); B)= Ramilla con pseudotecios; C)= Pseudotecios en diferentes etapas de desarrollo y micelio (mi); D)= Corte transversal de un pseudotecio; E)= Primordio de pseudotecio (pri); F)= Ascas con ascosporas. G y H)= Ascosporas con tubos germinativos (Tg). I)= Colonia de color gris a verde olivo en PDA a los 60 días.

A)= Commercial plantation of *P. menziesii* var. *glauca* infected by *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak); B)= Twig with pseudothecia; C)= Pseudothecia in different development stages and mycelium (mi); D)= Cross-cutting of a pseudothecium; E)= Pseudothecium primordium (pri); F)= Asci with ascospores; G and H)= Ascospores with germination tubes (Tg); I)= Grey to olive green color in PDA after 60 days.

Figura 2. Árboles de Navidad de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr en el Estado de México.

Figure 2. *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr Christmas Trees in Mexico State.

se registró de mayo a agosto con una media de 17 °C (Figura 3 B); en ambos sitios la mayor dispersión de ascosporas ocurrió entre junio y julio.

En primavera y verano las infecciones causadas por *P. gaumannii* dependen de las condiciones de humedad, momento que concuerda con la emergencia de brotes y elongación de las yemas jóvenes, lo que coincide con lo publicado por Stone *et al.* (2008b), quienes documentan que las condiciones ambientales son factores indispensables para que se presente la liberación de ascosporas en la costa de Oregon; Michael y Chastagner (1984) registraron que en Washington, inicia en abril y se prolonga hasta septiembre, con la máxima dispersión entre junio y julio. La diseminación es 10 veces mayor en follaje con acículas de 1 año, en comparación con las de 2 años de edad; además, en condiciones de laboratorio, los ascostromas hidratados sueltan 75 % de las ascosporas en 20 minutos y el contenido completo en 4 horas; para ello, se considera un intervalo de temperatura de 5 a 30 °C, el máximo esparcimiento ocurre alrededor de los 20 °C.

Los pseudotecios pueden presentarse en abundancia sobre hojas de 2 años o más, o de manera escasa en las más jóvenes; sin embargo en las plantaciones forestales de la costa de Oregon se detectó abundancia de cuerpos fructíferos en la fronda del año en curso (Hansen *et al.*, 2000). Las ascosporas son movilizadas por el viento; aquellas que se depositan en la superficie de la acícula germinan y su micelio penetra a través del estoma hasta alcanzar el mesófilo. Stone *et al.* (2008a) observaron que los extremos de cada célula de la espora dan origen a una hifa hialina, y cuando tiene una longitud aproximada de 20 µm cambia a color café oscuro. También consiguieron anastomosis y el efecto de la topografía de la superficie de la acícula sobre la ramificación de la hifa; que la formación del apresorio se origina en las ramas laterales cortas del tubo germinativo principal o de algún extremo de la ascospora que se encuentre cerca de un estoma; y la penetración se da por una hifa infectiva que se introduce en las células guarda y avanza en la cámara subestomática, sitio donde se desarrolla e invade intercelularmente para llegar al mesófilo.

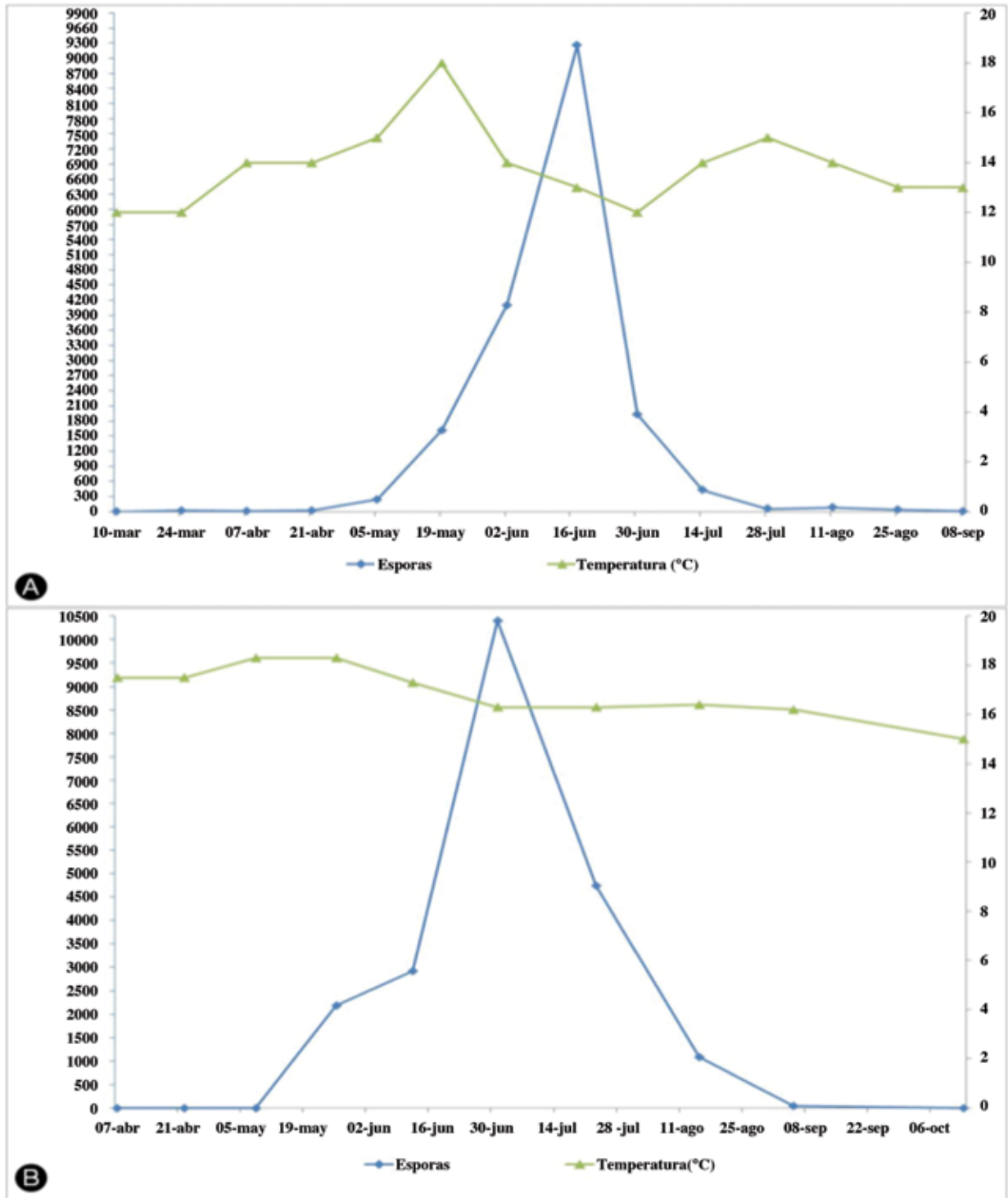
La colonización intercelular tiene lugar durante el otoño, a partir de células del primordio que se localizan dentro del mesófilo y en la cámara subestomática y darán origen a la emergencia del cuerpo fructífero a través del estoma. En esta temporada es cuando ocurre la infestación en la superficie de la acícula, vía el micelio epifítico. En el invierno, se observan estructuras esféricas de color oscuro y al final de la estación, los pseudotecios inmaduros, con dimensiones de 50 a 70 µm de diámetro se identifican a simple vista en el envés de las acículas. Manter *et al.* (2005) y Stone *et al.* (2007) consideran que la temperatura prevaleciente en el invierno y la humedad en la primavera se correlacionan con la severidad del tizón

1 year needles, compared to those of 2 years; moreover, in laboratory conditions, the hydrated ascostromes release 75 % of the ascospores in 20 minutes and the entire content in 4 hours; for this, it is considered a temperature range of 5 to 30 °C, the maximum scattering occurs at about 20 °C.

Pseudothecia may be abundant on leaves of 2 years or more; or very scarce in the younger ones; however in forest plantations in the Oregon Coast abundance of fruiting bodies was detected in the frond of the year (Hansen *et al.*, 2000). The ascospores are transported by wind; those that are deposited on the surface of the needle germinate and their mycelium penetrates through the stoma to reach the mesophyll. Stone *et al.* (2008a) found that the ends of each cell of the spore give rise to a hyaline hyphae, and when they have an approximate length of 20 microns they turn to dark brown. They recorded anastomosis and also the effect of the topography of the surface of the needle on hyphal branching; appressorium formation originates from the short side branches of the main germ tube or from some end of the ascospore that is near a stoma; and penetration is given by an infective hyphae that enters the guard cells and advances in the substomatal chamber, place where it develops and invades intercellularly to reach the mesophyll.

Intercellular colonization occurs during fall, from the primordium cells that are located within the mesophyll and the substomatic chamber and give rise to the emergence of the fruiting body through the stoma. At this time the infestation is occurring on the surface of the needle via the epiphytic mycelium. In the winter, dark-colored spherical structures are observed and at the end of the season, the immature pseudothecia, with dimensions of 50 to 70 µm in diameter are identified with the naked eye on the underside of needles. Manter *et al.* (2005) and Stone *et al.* (2007) consider that the prevailing temperature in the winter and spring moisture correlate with the severity of Swiss Needle Cast in *Pseudotsuga* plantations of Oregon. Stone *et al.* (2007, 2008b) conclude that the increase in winter temperatures and moisture in spring and the abundance of rain are epidemiological factors that influence the distribution and severity of the disease caused by *P. gaumannii*.





A) Tres Encinos, Valle de Bravo (Estado de México) in 2006. B) Seed Area (Rancho Chichicaxtla), Aquixtla, Puebla in 2009.

Figura 3. Época de liberación de ascosporas de *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak) en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr.

Figure 3. Time of *Phaeocryptopus gaeumannii* Rhode (Petrak) ascospore dispersal in *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Mayr plantations.

suizo en las plantaciones de *Pseudotsuga* en Oregon. Stone *et al.* (2007, 2008b) concluyen que el incremento de las temperaturas invernales y la humedad presente en primavera, por la abundancia de lluvias, son factores epidemiológicos que influyen sobre la distribución y la severidad de la enfermedad originada por *P. gaemannii*.

CONCLUSIONES

Con base en las características morfológicas y moleculares se concluye que el hongo causante de la defoliación prematura en *P. menziesii* var. *glauca* es el hongo *P. gaemannii*, que tiene amplia distribución en México y en este estudio se localizó en bosques naturales de *P. menziesii* var. *glauca* de la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur, lo que permite concluir que es un hongo nativo que, también, está presente en las plantaciones de árboles de Navidad del centro de México.

Los periodos de inicio y final de la liberación de ascosporas se registraron de marzo a septiembre, y alcanzó su máximo entre junio y julio, cuando prevalece una alta humedad relativa (>90 %) y temperatura de 13 ± 1 °C en las plantaciones del Estado de México y Puebla.

REFERENCIAS

- Cibrián, T., D., D. Alvarado R. y S. E. García D. 2007. Enfermedades forestales en México / Forest diseases in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo; Conafor-Semarnat, México; Forest Service USDA, USA; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO. Chapingo, Edo. de Méx. México. 587 p.
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2009. Plantaciones Forestales Comerciales: Árboles de Navidad. Jalisco, México. <http://www.conafor.gob.mx>. (05 de diciembre de 2010)
- Debreczy, Z. and I. Rác. 1995. New species and varieties of conifers from México. *Phytologia* 78(4): 217-243.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hansen, E. M., J. K. Stone, B. R. Capitano, P. Rosso, W. Sutton, L. Winton, A. Kanaskie and M. G. McWilliams. 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in Coastal Oregon. *Plant Disease* 84(7): 773-778.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David and J. A. Stalpers. 2001. *Dictionary of the fungi*, 9th edition. Ainsworth and Bisby's. CABI Europe. Wallingford, Oxfordshire, UK. 784 p.
- Łakomy, P. and M. Iwańczuk. 2010. *Phaeoeryptopus gaemannii* in douglas-fir stands in smolarz forest district. *Phytopathologia* 58: 43-52
- Manter, K. D., B. J. Bond, K. L. Kavanagh, P. H. Rosso and G. M. Filip. 2000. Pseudothecia of the Swiss needle cast fungus, *Phaeoeryptopus gaemannii*, physically block stomata of Douglas - fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytologist* 148(3): 481-491.
- Manter, K. D., P. W. Reeser and J. K. Stone. 2005. A climate - based model for predicting geographic variation in Swiss needle cast severity in the Oregon Coast Range. *Phytopathology* 95(11): 1256-1265.
- Martínez, M. 1963. *Las Pináceas Mexicanas*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ed. Botas. México, D.F. México. 400 p.

CONCLUSIONS

Based on morphological and molecular characteristics it is concluded that the fungus causing premature defoliation in *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* is *Phaeoeryptopus gaemannii*, a fungus that is widely distributed in Mexico and in this study was located in natural forests of the Sierra Madre Occidental, the Sierra Madre Oriental and Sierra Madre del Sur, which leads to the conclusion that it is a native fungus also found in Christmas tree plantations in central Mexico.

Periods of the beginning and end of the release of ascospores were recorded from March to September, and peaks in June and July, when high relative humidity (> 90 %) and temperature of 13 ± 1 °C prevail in plantations of Mexico State and Puebla.

End of the English version

- Michaels, E. and G. A. Chastagner. 1984. Seasonal availability of *Phaeoeryptopus gaemannii* ascospores and conditions that influence their release. *Plant Disease* 68(11): 942 - 944.
- Morales, R., E. Sanfuentes, I. Vives and E. Molina. 2012. *Phaeoeryptopus gaemannii*, patógeno causante del "swiss needlecast" en *Pseudotsuga menziesii*: antecedentes de su biología, medidas de control y situación en Chile. *Bosque* 33(2): 127-134.
- Osorio, O. M. 2007. Detección del hongo defoliador *Phaeoeryptopus gaemannii* en plantaciones de *Pseudotsuga menziesii* de Valdivia, Chile. *Bosque* 28(1): 69-74.
- Ostrey, E. M. and T. H. Nicholls. 1982. A technique for tramping fungal spores. *Research Note N C-283*. 12 p. United States Department of Agriculture, Forest Service. <http://www.fs.fed.us/> (10 de diciembre de 2010).
- Rzedowski, J. 1994. *La vegetación de México*. Limusa. México, D.F. México. 432 p.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Volume 1, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY. USA. 2344 p.
- Stone, J. K. and G. Carroll. 1985. Observations of the development of ascocarps in *Phaeoeryptopus gaemannii* and on the possible existence of an anamorphic state. *Sydowia, Annales Mycologici Ser* 2(38): 317-323.
- Stone, J. K., I. A. Hood, M. S. Watt and J. L. Kerrigan. 2007. Distribution of Swiss needle cast in New Zealand in relation to winter temperature. *Australasian Plant Pathology* 36(5): 445-454.
- Stone, J. K., B. R. Capitano and J. L. Kerrigan. 2008a. The histopathology of *Phaeoeryptopus gaemannii* on douglas - fir needles. *Mycological* 00(3): 431-444.
- Stone, J. K., L. B. Coop and D. K. Manter. 2008b. Predicting effects of climate change on Swiss needle cast disease severity in Pacific Northwest forests. *Canadian Journal Plant Pathology* 30: 169-176.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (ed).* *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA. USA. pp: 315-322.
- Winton, M. L., J. K. Stone, E. M. Hansen and R. A. Shoemaker. 2007. The systematic position of *Phaeoeryptopus gaemannii*. *Mycologia* 99(2): 240-252.

