



Artículo / Article

Fusarium oxysporum Schltld. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.
causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero

Fusarium oxysporum Schltld. and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.
cause wilting of *Pinus* spp. seedlings in the nursery

Leticia Robles Yerena¹, Santos Gerardo Leyva Mir², Armando Cruz Gómez²,
Moisés Camacho Tapia³, Daniel Nieto Ángel³ y Juan Manuel Tovar Pedraza²

Resumen

Las coníferas pueden tener daños importantes por enfermedades en vivero, entre las que destacan la pudrición de raíz y marchitez de plántulas. En *Pinus* spp. se les reconoce como un padecimiento en diversas regiones del mundo. Durante 2013 y 2014 se observaron tales síntomas, además de amarillamiento de plantas en estados iniciales de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* en un vivero forestal en el estado de Guerrero, México. Así, se propuso el presente estudio, cuyos objetivos consistieron en identificar a los hongos fitopatógenos asociados con ese problema, mediante la caracterización morfológica de las estructuras de reproducción asexual; análisis de secuencias ITS del ADNr y pruebas de patogenicidad; además de, determinar la incidencia y severidad de cada una de las especies de patógenos de interés. A partir de las plántulas con manifestaciones de daño de las dos especies de pino, se obtuvieron ejemplares aislados pertenecientes al género *Fusarium*. La caracterización morfológica, prueba de patogenicidad, y análisis de secuencias ITS de tales organismos evidenciaron que *F. solani* y *F. oxysporum* son las especies fúngicas responsables de ocasionar los síntomas de marchitez de plantas de *Pinus*. No se observó diferencia significativa entre la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por dichos agentes.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* Schltld., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., incidencia, patogenicidad, *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham., *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Abstract

Conifers can suffer significant damage due to diseases in the nursery, primarily root rot and wilting of the seedlings; in *Pinus* spp. they are recognized as an ailment in various regions of the world. These symptoms -along with initial stages of yellowing of *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* plants- were observed during 2013 and 2014 in a forest nursery in the state of Guerrero, Mexico. Thus, the present study was proposed, with the objective of identifying the phytopathogenic fungi associated with the problem through the morphological characterization of their asexual reproductive structures, analysis of the sequences of ITS regions of the rDNA, and pathogenicity tests, as well as of determining the incidence and severity of each of the pathogenic species of interest. Based on the seedlings of the two species of interest showing signs of damage, isolated specimens of the *Fusarium* genus were obtained. The morphological characterization, pathogenicity test, and analysis of sequences of ITS regions of these organisms proved that *F. solani* and *F. oxysporum* are the fungal species that cause symptoms of wilting of *Pinus* plants. No significant difference was observed between the incidence and the severity of the disease caused by these agents.

Key words: *Fusarium oxysporum* Schltld., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., incidence, pathogenicity, *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham., *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Fecha de recepción/Reception date: 2 de junio de 2016; Fecha de aceptación/Acceptance date: 29 de julio de 2016.

¹ Posgrado en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. México.

² Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. México. Correo-e: jmtovar@colpos.mx

³ Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. México.

Introducción

La superficie forestal en México supera 144 millones de hectáreas, lo que equivale a 74 % del territorio nacional; casi 120 millones de hectáreas son severamente explotadas sin un manejo correcto, lo que propicia un gran deterioro (Cibrián *et al.*, 2007).

El pino mexicano (*Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham.) es una de las principales especies utilizadas para las plantaciones comerciales intensivas en el país y en el extranjero, debido a su tasa de crecimiento excepcionalmente rápido, buena forma de tronco y características favorables de la madera para los productos de celulosa (Dvorak *et al.*, 2000). El pino blanco (*Pinus pseudostrobus* Lindl.) tiene una amplia distribución geográfica natural en México y ofrece buena calidad de madera y productividad (Perry, 2009).

En los últimos años, en México se ha considerado conveniente reconocer la importancia de las enfermedades forestales en cuatro escenarios: bosques naturales, plantaciones, viveros forestales y árboles en áreas urbanas. El *damping-off* o marchitez de plántulas es una de las primeras enfermedades que el viverista enfrenta y que en ocasiones le causa entre 15 y 40 % de merma (Cibrián *et al.*, 2007). Además de, ser una limitante para la producción de algunos taxa, sobre todo de coníferas, constituye uno de los obstáculos más serios en la producción de plantas a gran escala (Torres, 2003).

Los árboles de coníferas pueden sufrir un daño significativo por enfermedades en vivero, causadas por *Fusarium* spp. Estos hongos fitopatógenos son responsables tanto de *damping-off* en pre y posemergencia, como de que las infecciones latentes resulten en el fracaso de las plántulas trasplantadas y en su establecimiento (Cibrián *et al.* 2007; Gordon *et al.*, 2015). *Fusarium oxysporum* Schltdl. se ha reconocido como la causa más importante de la pudrición de raíz e hipocotilo, en viveros. Asimismo, el manejo de las enfermedades de raíz provocadas por *Fusarium* en dicho ámbito se basa, principalmente, en la fumigación de suelos antes de la siembra (Gordon *et al.*, 2015).

En este contexto, los objetivos propuestos en el presente estudio consistieron en identificar a las especies de fitopatógenos causantes de los síntomas de pudrición de raíces y marchitez de plántulas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, mediante la combinación de su caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS del ADNr, y pruebas de patogenicidad, así como determinar la incidencia y severidad provocada por los patógenos responsables de inducir dicha enfermedad.

Introduction

The forest area of Mexico exceeds 144 million hectares, amounting to 74 % of the national territory. Almost 120 million hectares are severely exploited without correct management, resulting in significant deterioration (Cibrián *et al.*, 2007).

The Mexican pine (*Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham.) is one of the main species used for intensive commercial plantations in Mexico and abroad, due to its exceptionally rapid growth rate, to the good shape of its stem and to the favorable characteristics of its timber for cellulose products (Dvorak *et al.*, 2000). White pine (*Pinus pseudostrobus* Lindl.) has a wide natural geographical distribution and provides good-quality wood and high productivity (Perry, 2009).

In recent years, it has been deemed convenient to acknowledge the importance of forest diseases in four settings: natural forests, plantations, forest nurseries, and trees in urban areas. The damping-off or wilting of the seedlings is one of the first diseases that the nursery keepers face, causing between 15 and 40 % of loss (Cibrián *et al.*, 2007). Besides being a limiting factor for the production of certain species, particularly conifers, it is one of the most serious obstacles to the large-scale production of plants (Torres, 2003).

The conifer trees can suffer significant damage due to diseases caused by *Fusarium* spp. in the nursery. These species of phytopathogenic fungi can cause damping-off in both pre- and post-emergence, as well as latent infections that can result in the failure of transplanted seedlings and in their establishment (Cibrián *et al.* 2007; Gordon *et al.*, 2015). *Fusarium oxysporum* Schltdl. has been recognized as the main cause of root and hypocotyl rot in the nurseries. Furthermore, the management of root diseases caused by *Fusarium* in this environment has consisted primarily in soil fumigation before sowing (Gordon *et al.*, 2015).

Based on this, the objectives proposed in this study were to identify the phytopathogenic species that cause the symptoms of root rot and seedling wilt in *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* through the combination of morphological characterization, analysis of the sequences of the ITS regions of rDNA, and pathogenicity tests, besides determining the incidence and severity caused by the pathogens inducing that disease.



Materiales y Métodos

Recolección de muestras

Durante 2013 y 2014 se llevó a cabo un muestreo dirigido en un vivero forestal localizado en Chilpancingo, Guerrero, México, en donde se recolectaron 20 plántulas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* con síntomas de marchitez y pudrición de raíz.

Aislamiento, purificación y conservación de hongos

Para aislar al agente causal, se desinfectaron fragmentos de raíces de *P. patula* y *P. pseudostrobus* con síntomas de pudrición seca; para ello, se utilizó la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min; enseguida se lavaron dos veces en agua destilada esterilizada y se colocaron en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 20 mL de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco), con estreptomycin (Sigma®). Las cajas se colocaron en incubación a 25 °C, bajo un régimen de 12 h luz / 12 h de oscuridad.

Después de tres días de incubación, las colonias fúngicas con mayor frecuencia se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA fresco y se colocaron en incubación bajo las condiciones anteriormente descritas. Una vez que se produjeron esporas, la purificación de los aislados se realizó con la técnica de cultivos monospóricos, mediante la transferencia de una espora a medio de cultivo PDA fresco. La conservación de los aislamientos se llevó a cabo con la transferencia de discos miceliales (5 mm de diámetro) a tubos criogénicos de 2 mL, con 1.5 mL de glicerina al 20 % (v/v) y almacenados a -80 °C.

Caracterización morfológica

La identificación de los aislados fúngicos se realizó a partir de la caracterización morfológica de sus estructuras de reproducción asexual. Para ello, fueron transferidos a medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 °C bajo condiciones de luz continua. Después de 12 días de incubación, se hicieron preparaciones semipermanentes en glicerina al 100 %, con la finalidad de reconocer sus componentes en el microscopio compuesto *Olympus* BX41. Se efectuó la observación de 100 macroconidios y 100 microconidios, se registró la forma, tamaño, coloración y número de septos. Para la formación de filídes fue necesario cultivar los aislados fúngicos en medio de cultivo a base de puré de papa-agar durante cuatro días. Posteriormente, se preparó una cámara húmeda en una caja Petri de 90 mm con papel secante humedecido a punto de saturación, con agua destilada estéril; se transfirieron discos de 5 mm de PDA con crecimiento micelial y se incubaron durante tres días. Una vez transcurrido el tiempo, las filídes producidas en la cámara húmeda se observaron en el microscopio compuesto antes señalado. La identificación morfológica de los hongos, a nivel

Materials and Methods

Sample collection

During 2013 and 2014, a directed sampling procedure was carried out in a forest nursery located in *Chilpancingo, Guerrero, Mexico*, where 20 *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* seedlings with symptoms of root rot and wilting.

Fungi isolation, purification and preservation

In order to isolate the causative agent, fragments of *P. patula* and *P. pseudostrobus* roots with symptoms of dry rot were decontaminated by immersion in a sodium hypochlorite solution at 2 % during 3 minutes; the fragments were washed twice in sterilized distilled water and placed in Petri dishes with a 90 mm diameter in 20 mL of potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (Difco) with streptomycin (SigmaTM). The dishes were placed in incubation at a temperature of 25 °C, under a regime of 12 h light/12 h darkness.

After three days of incubation, the fungal colonies which occurred most frequently were transferred to Petri dishes with a fresh PDA culture medium and placed in incubation under the conditions described above. Once the colonies produced spores, the isolates were purified using the monospore culture technique, transferring a simple spore to a fresh PDA culture medium. Fungal isolates were preserved through the transference of mycelial disks (of 5 mm diameter) to 2 mL cryogenic tubes with 1.5 mL glycerin at 20 % (v/v) and stored at a temperature of -80 °C.

Morphological characterization

The fungal isolates most frequently separated were identified through the morphological characterization of the asexual reproduction structures. For this purpose, they were transferred to a PDA culture medium and incubated at 25 °C under continuous light. After 12 days of incubation, semipermanent preparations were made in glycerin at 100 % in order to examine their components under the *Olympus* BX41 compound microscope. 100 macroconidia and 100 microconidia were observed; their shape, size, color and number of septa were recorded. For the formation of phyalides, the fungal isolates had to be cultivated in a potato-agar culture medium for four days. Subsequently, a humid chamber was prepared in a 90 mm Petri dish with blotting paper moistened to saturation point with sterilized distilled water; 5 mm PDA disks with mycelium growth were transferred and incubated during three days, after which the phyalides produced in the humid chamber were observed under the described compound microscope. The fungi were morphologically identified at genus level using specialized codes (Barnett and Hunter, 1998); their

de género, se llevó a cabo con el uso de claves especializadas (Barnett y Hunter, 1998); la identificación de las especies se basó en las descripciones de Leslie y Summerell (2006).

Prueba de patogenicidad

La patogenicidad de seis aislados identificados morfológicamente como *Fusarium*, se determinó con base en la inoculación de 70 plántulas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* de un año de edad. La inoculación se hizo por inmersión de las raíces en una suspensión de conidios (1×10^6 esporas mL^{-1}) por 10 h. Se utilizaron 10 plántulas de cada especie, cuyas raíces se colocaron por 10 h en agua destilada estéril, mismas que sirvieron como testigo. Concluido este paso, las plántulas se depositaron, individualmente, en macetas con *Peat Moss* y agrolita (2:1), las cuales se colocaron en un invernadero bajo condiciones de 20 a 25 °C y humedad relativa de 50-80 %. La prueba de patogenicidad se efectuó dos veces.

La incidencia de la enfermedad se determinó mediante el registro de los síntomas y el número de árboles muertos. Con estos datos se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), con el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990). La severidad de la enfermedad se estimó por aislado fúngico y en cada una de las dos especies de *Pinus*, con la fórmula de Townsend y Hueberger:

$$DS (\%) = [\sum (nv) / NV] \times 100$$

Donde:

- n = Grado de infección acorde a la escala
- v = Número de plantas por categoría
- N = Grado máximo de infección
- V = Número de plantas en total

De acuerdo a los diferentes grados de infección, se definió una escala porcentual de la severidad aparente, de la siguiente manera: Clase 0 = 0 % de daño (planta asintomática); Clase 1 = 20 % de daño (acículas caídas); Clase 2 = 40 % de daño (clorosis o amarillamiento); Clase 3 = 60 % de daño (puntas secas); Clase 4 = 20 % de daño (marchitez); Clase 5 = 20 % de daño (plantas muerta). Con los resultados obtenidos a partir de las interacciones de cada uno de los aislados y las dos especies de pino evaluadas, se construyeron curvas de progreso de la enfermedad, las cuales fueron ajustadas a modelos epidemiológicos (Logístico, Exponencial, Monomolecular y Gompertz) con la finalidad de determinar los parámetros de intensidad inicial de la enfermedad (I_0) y la tasa de incremento (r), y con ello tener un indicativo de la forma y estructura de desarrollo de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990). El ajuste de los modelos epidemiológicos y ABCPE se realizó con el programa SAS ver. 9.3. (SAS, 2011).

identification at species level was based on the descriptions by Leslie and Summerell (2006).

Pathogenicity test

The pathogenicity of six isolates morphologically identified as *Fusarium* was determined through the inoculation of 70 one-year-old *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* seedlings. The inoculation was carried out by immersing the roots in a suspension of conidia (1×10^6 spores mL^{-1}) during 10 hours. Ten seedlings of each species, whose roots were placed in sterilized distilled water during 10 h, served as controls. After this step was concluded, the seedlings were individually planted in flowerpots with peat moss and agrolite (2:1) and placed in a nursery at a temperature of 20 to 25 °C and a relative humidity of 50-80 %. The pathogenicity test was carried out twice.

The incidence of the disease was determined by the recorded symptoms and the number of dead trees. With these data, the area under the progress curve of the disease (AUDPC) using the trapezoidal integration method (Campbell and Madden, 1990). The severity of the disease was estimated for each fungal isolate and in each of the two *Pinus* species using the formula of Townsend and Hueberger:

$$DS (\%) = [\sum (nv) / NV] \times 100$$

Where:

- n = Degree of infection according to the scale
- v = Number of plants per category
- N = Maximum degree of infection
- V = Total number of plants

According to the various degrees of infection, an apparent severity rating scale was devised as follows: Class 0 = 0 % damage (asymptomatic plant); Class 1 = 20 % damage (fallen needles); Class 2 = 40 % damage (chlorosis or yellowing); Class 3 = 60 % damage (dry tips); Class 4 = 20 % damage (wilting); Class 5 = 20 % damage (dead plant). With the results obtained based on the interactions of each of the isolates and the two assessed pine species, disease progress curves were built and adjusted to epidemiological models (Logistic, Exponential, Monomolecular and Gompertz) in order to determine the parameters of intensity at the onset of the disease (I_0), and the increase rate (r) and thus, to obtain a signal of the form and development structure of the disease (Campbell and Madden, 1990). The epidemiological models and the AUDPC were adjusted using the SAS 9.3 software (SAS, 2011).



Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

La extracción de ADN genómico de seis aislados fúngicos evaluados en la prueba de patogenicidad e identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Fusarium* se hizo mediante la maceración de 50 a 100 mg del micelio de colonias con 10 días de edad. Posteriormente, se siguió el protocolo indicado en el kit de extracción *Plant DNeasy Mini Kit* (Qiagen®). La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, con buffer de corrida TBE 0.5 X, para lo cual se usaron 5 μ L de ADN, a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Docmod 2000 (BIORAD®).

Para la PCR se utilizaron los iniciadores universales ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ L, buffer de PCR 1X, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 μ M de cada primer, 1U ADN polimerasa BioTecMol® y 100 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 (BIORAD®) con una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Docmod 2000 (BIORAD®).

Los fragmentos amplificados con los iniciadores ITS5/ITS4, se purificaron siguiendo el protocolo de *DNA clean and concentrator* (Zymo Research®). Para ello, en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se agregaron 5 volúmenes del buffer *DNA Binding* y se mezcló por inversión. La mezcla se transfirió en una columna *Zymo-Spin* en un tubo de colección de 2 mL. Se centrifugó durante 30 s a 8 000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 μ L de buffer *DNA Wash* dentro de la columna y se centrifugó durante 30 s a 8 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se cambió a un tubo nuevo de 2 mL. Se adicionaron 60 μ L buffer de *DNA Elution* directamente en la columna, y el producto se incubó durante 1 min. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se diluyó el ADN. Los fragmentos de ADN purificados se mandaron a secuenciar a la empresa *Macrogen*® de Corea. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos en NCBI con la herramienta *BLASTn*.

Resultados y Discusión

Identificación morfológica

Del material vegetal sintomático se obtuvieron seis aislados, de los cuales los de mayor frecuencia fueron de dos tipos: el primero mostró crecimiento micelial blanco-amarillento, y el segundo crecimiento micelial inicialmente blanco, pero con el paso del tiempo se tornó de color rojo-violáceo; ambos tipos de crecimiento fueron afelpados. Tales tipos de colonias se han

DNA extraction, amplification by PCR and sequentiation

Genomic DNA of six fungal isolates assessed in the pathogenicity test and morphologically identified as belonging to the *Fusarium* genus was extracted by macerating 50 to 100 mg of mycelium from 10 day old colonies. Subsequently, the protocol indicated in the *Plant DNeasy Mini Kit* (Qiagen®) extraction kit was followed. The quality of the DNA was verified by electrophoresis in agarose gel at 0.8 % with 0.5 X TBE buffer using 5 μ L of the DNA and run with 90 volts. The gel was analyzed in a *Gel-Docmod 2000* (BIORAD®) transilluminator.

The universal initiators ITS5/ITS4 were used for the PCR (White *et al.*, 1990). The reaction mixture was prepared at a final volume of 25 μ L, with a 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.4 μ M of each primer, 1U of DNA polymerase (BioTecMol®) and 100 ng of DNA. The PCR was carried out in a C1000 (BIORAD®) thermocycler with an initial denaturalization of 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72°C. The amplified products were verified by electrophoresis in agarose gel at 0.8 %. The gel was analyzed in a *Gel-Docmod 2000* (BIORAD®) transilluminator.

The fragments amplified with the ITS5/ITS4 initiators were purified using the *DNA clean and concentrator* protocol (Zymo Research®). For this purpose, 5 volumes of the *DNA Binding* buffer were added in a 1.5 mL microcentrifuge tube and mixed by inversion. The mixture was transferred to a *Zymo-Spin* column in a 2 mL collection tube. It was centrifuged for 30 s at 8 000 rpm, and the supernatant was discarded. 200 μ L of the *Wash DNA* buffer were added to the column and centrifuged for 30 s at 8 000 rpm. The supernatant was discarded, and the mixture was transferred to a new 2 mL tube. 60 μ L of *Elution DNA* buffer were added directly to the column, and the product was incubated during 1 min. The column was transferred to a new 1.5 mL tube and the DNA was diluted. The purified DNA fragments were sent to the Korean enterprise *Macrogen*® for sequencing. The sequences thus obtained were compared in the database at the NCBI using the *BLASTn* tool.

Results and Discussion

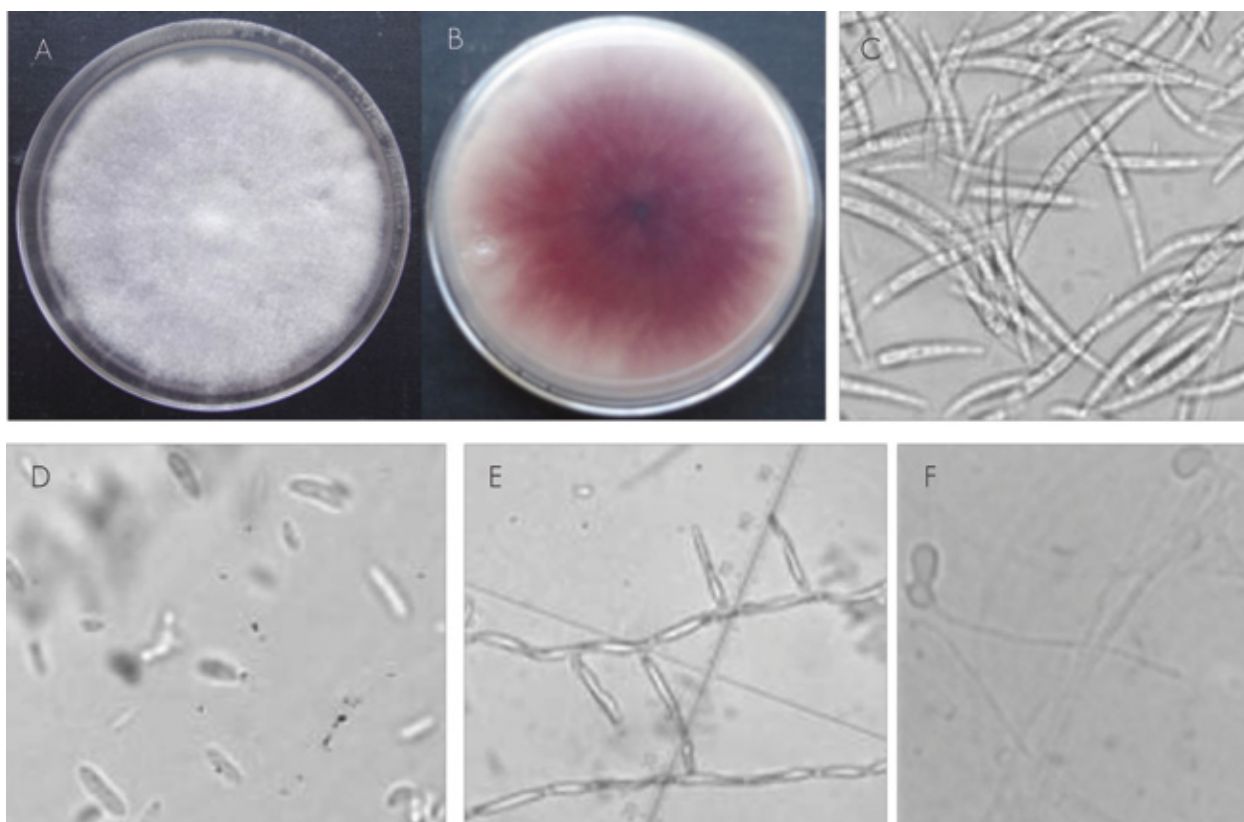
Morphological identification

Six isolates were obtained from the symptomatic vegetal material; of these, two types were found to be the most frequently occurring: the first showed white-yellow mycelium growth, and the second, initially white mycelium growth that, however, turned purple-red with time; both growths were velvety. These types of colonies have been recorded for *Fusarium* species (Nelson *et al.*, 1983; Leslie and Summerell, 2006).

registrado para especies de *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006).

El aislado con crecimiento micelial de coloración púrpura-violeta en medio de cultivo PDA (Figura 1A-B), presentó macroconidios falcados, hialinos, con pared delgada, de 3-5 septos, de 19-43 x 3.1-5.4 µm y con célula basal en forma de pie (Figura 1C). Microconidios elípticos a ovales, unicelulares (Figura 1D). Monofialides no ramificadas cortas y agudas (Figura 1E). Clamidosporas en pares, intercalares y terminales (Figura 1F). Todas las características coincidieron con lo consignado por Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium oxysporum*.

The isolate with purple-violet mycelium growth in a PDA culture medium (Figure 1A-B) had 19-43 x 3.1-5.4 µm sickle-shaped, hyaline, thin-walled macroconidia with 3-5 septa and with a foot-shaped basal cell (Figure 1C). Elliptic to oval unicellular microconidia (Figure 1D). Short, sharp unbranched monophialides (Figure 1E). Intercalary and terminal chlamydospores in pairs (Figure 1F). All the characteristics agreed with those recorded by Leslie and Summerell (2006) for *Fusarium oxysporum*.



A) Colonia de 8 días de edad; B) Reverse de colonia con coloración roja-púrpura; C) Macroconidios; D) Microconidios; E) Filíalides; F) Clamidosporas.
A) Eight-day colony; B) Reverse of the colony with a purple-red color; C) Macroconidia; D) Microconidia; E) Phialides; F) Chlamydospores

Figura 1. Morfología de colonias y estructuras de reproducción asexual de *Fusarium oxysporum* Schltdl. obtenido de raíces de *Pinus* spp. con síntomas de pudrición de raíz

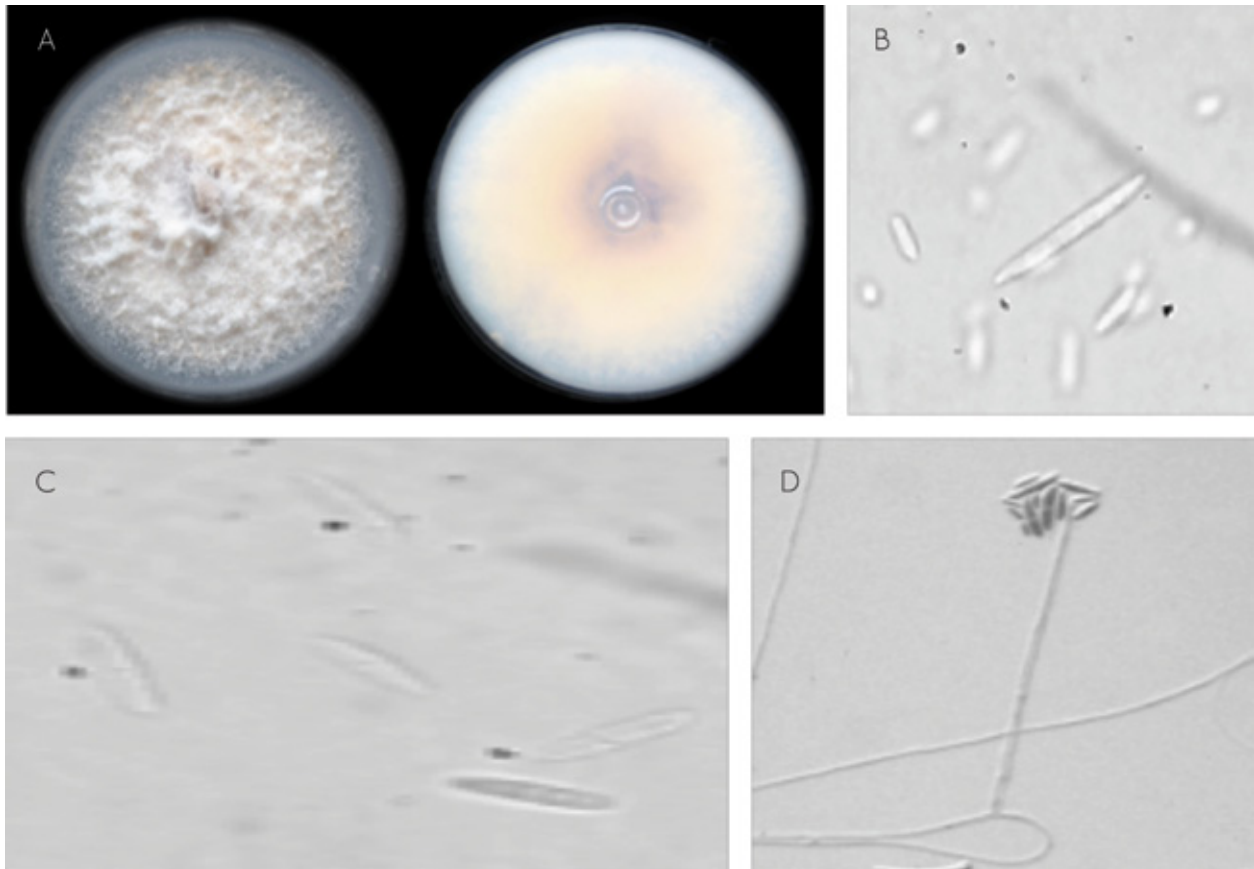
Figure 1. Morphology of colonies and asexual reproductive structures of *Fusarium oxysporum* Schltdl. taken from *Pinus* spp. with root rotting symptoms.

El aislado fúngico con crecimiento micelial algodonoso blanco-amarillento (Figura 2A-B) exhibió macroconidios hialinos, fusiformes, robustos, con 5-6 septos, con la célula apical levemente encorvada y puntiaguda (Figura 2C). Los microconidios fueron ovales y reniformes, hialinos, con 1-2 septos (Figura 2D), y producidos en monofialides largas (Figura 2E). Las clamidosporas se formaron rápidamente, ovales, intercalares entre las hifas o terminales en las ramas laterales de las mismas, se presentaron solas y en pares. Todas las características coincidieron

On the other hand, the fungal isolate with white-yellow cottony mycelium growth (Figure 2A-B) exhibited robust hyaline, fusiform macroconidia with 5-6 septa and with a slightly curved and pointed apical cell (Figure 2C). The microconidia were hyaline, oval and kidney-shaped, with 1-2 septa (Figure 2D), and produced in long monophialides (Figure 2E). The chlamydospores were quickly formed; they were oval, intercalary between hyphae or terminals in the side branches of the hyphae, and occurred individually and in pairs.

con los resultados de Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Teleomorfo: *Haematonectria haematococca*).

All the characteristics agreed with the findings of Leslie and Summerell (2006) for the *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. species (Teleomorfo: *Haematonectria haematococca*).



A) Colonia de 8 días de edad; B) Reverso de colonia con coloración amarillenta; C) Macroconidios; D) Microconidios; E) Fíalides.

A) Eight-day colony; B) Reverse of the colony with a yellowish color; C) Macroconidia; D) Microconidia; E) Phialides.

Figura 2. Morfología de colonias y estructuras de reproducción asexual de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. obtenido de raíces de *Pinus* spp. con síntomas de pudrición de raíz.

Figure 2. Figure 1. Morphology of colonies and asexual reproductive structures of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. taken from *Pinus* spp. with root rotting symptoms.

Análisis de secuencias ITS

Las secuencias obtenidas a partir del ADN de los seis aislados fúngicos identificados morfológicamente como *Fusarium* se compararon con las secuencias de la base de datos del *GenBank*, cinco de ellas (KU056813, KU056814, KU056816, KU056817, KU056818) mostraron 99 % de identidad con *F. oxysporum*, mientras que una (KU056815) presentó 99 % de identidad con las de *Fusarium solani*. Lo anterior confirmó los resultados de la caracterización morfológica; por lo tanto ambas especies del género de interés están involucradas como agentes causales de enfermedades de la raíz en *Pinus* spp., en México.

A *Fusarium oxysporum* se le reconoce como agente infeccioso de *Pinus strobus* L. en Estados Unidos de América (Ocamb

Analysis of the sequences of ITS regions

The sequences obtained from the DNA of the six fungal isolates morphologically identified as *Fusarium* were compared with the sequences submitted to the database of the *GenBank*, and five of them (KU056813, KU056814, KU056816, KU056817, KU056818) showed 99 % identity with *F. oxysporum*, while only one (KU056815) exhibited 99 % with those of *Fusarium solani*. This confirmed the results of the morphological characterization, which indicates that both species of the genus of interest are causative agents of root diseases in *Pinus* spp. in Mexico.

Fusarium oxysporum has been recognized as an infectious agent of *Pinus strobus* L. in the United States of America (Ocamb and Juzwik, 1995; Ocamb et al., 2002); *P. elliotii*

y Juzwik, 1995; Ocamb *et al.*, 2002); *P. elliotii* Engelm. y *P. taeda* L. en Argentina (Lori y Salerno, 2003); *P. wallichiana* A. B. Jaks en India (Hassan *et al.*, 2011); *P. halepensis* Miller en Argelia (Lazreg *et al.*, 2014) y *P. tecunumanii* F. Schwerdtf. ex Eguiluz & J. P. Perry en Colombia (Herron *et al.*, 2015). *Fusarium solani* se asocia con tejidos de *Pinus strobus* en Estados Unidos de América (Ocamb y Juzwik, 1995); *P. radiata* D. Don en Nueva Zelanda (Dick y Dobbie, 2002); *P. elliotii* y *P. taeda* en Argentina (Lori y Salerno, 2003); *P. tropicalis* Morelet en Cuba (Guerra *et al.*, 2004) y *P. halepensis* en Argelia (Lazreg *et al.*, 2014).

Prueba de patogenicidad

Quince días después de la inoculación (ddi), todas las plantas inoculadas con la suspensión de esporas exhibieron síntomas de marchitez, mientras que las plántulas testigo permanecieron asintomáticas. A partir de los ejemplares inoculados, se reaislaron colonias de *Fusarium*, las cuales presentaron las mismas características morfológicas que las inoculadas originalmente, lo que completó así los postulados de Koch. Esto confirmó que *Fusarium oxysporum* y *F. solani* son las especies de hongos fitopatógenos causantes de los síntomas de pudrición de raíz y marchitez en plántulas de *P. patula* y *P. pseudostrobus* en Guerrero, México. De manera similar, Herron *et al.* (2015) realizaron pruebas de patogenicidad exitosas con aislados de *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell, *F. marasianum* Herron, Marinc. & M. J. Wingf., *F. parvisorum* Herron, Marinc. & M. J. Wingf. y *F. sororula* Herron, Marinc. & M. J. Wingf. en plántulas de *Pinus patula* en Colombia. Latiffah *et al.* (2009) identificaron a *F. solani* y *F. oxysporum* como los hongos prevalentes en suelos de un área forestal en Malasia, pero no determinaron la patogenicidad de los aislados.

Incidencia y severidad de la enfermedad

Con respecto a la incidencia de la enfermedad, el aislado 1 de *F. oxysporum* tuvo 100 % únicamente en *P. pseudostrobus* a los 8 ddi, mientras que el aislado 2 de *F. oxysporum* registró el mismo porcentaje en igual periodo para las dos especies de *Pinus*. Igualmente, *F. solani* ocasionó 100 % de ella en los dos taxa de *Pinus* a los 14 ddi (Cuadro 1). Lo anterior es indicativo de que el aislado 2 de *F. oxysporum* causa enfermedad a una velocidad mayor que los demás, lo cual está sujeto a una combinación positiva de intensidad inicial de la enfermedad y una tasa de incremento, mientras que en los otros aislados no sucedió, y la velocidad en que se alcanzó la totalidad de infestación fue menor.

Engelm. and *P. taeda* L. in Argentina (Lori and Salerno, 2003); *P. wallichiana* A. B. Jaks in India (Hassan *et al.*, 2011); *P. halepensis* Miller in Algeria (Lazreg *et al.*, 2014), and *P. tecunumanii* F. Schwerdtf. ex Eguiluz & J. P. Perry in Colombia (Herron *et al.*, 2015). *Fusarium solani* has also been associated with *Pinus strobus* tissues in the United States of America (Ocamb and Juzwik, 1995); *P. radiata* D. Don in New Zealand (Dick and Dobbie, 2002); *P. elliotii* and *P. taeda* in Argentina (Lori and Salerno, 2003); *P. tropicalis* Morelet in Cuba (Guerra *et al.*, 2004), and *P. halepensis* in Algeria (Lazreg *et al.*, 2014).

Pathogenicity test

Fifteen days after inoculation (DAI), all the plants inoculated with the spores' suspension exhibited symptoms of wilting, while the control seedlings remained asymptomatic. *Fusarium* colonies were re-isolated from the inoculated specimens and exhibited the same morphological characteristics as the originally inoculated colonies, whereby Koch's postulates were completed. This confirmed that *Fusarium oxysporum* and *F. solani* are the species of phytopathogenic fungi that cause the symptoms of root rot and wilting of *P. patula* and *P. pseudostrobus* seedlings in Guerrero, Mexico. Similarly, Herron *et al.* (2015) carried out successful pathogenicity tests with *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell, *F. marasianum* Herron, Marinc. & M. J. Wingf., *F. parvisorum* Herron, Marinc. & M. J. Wingf. and *F. sororula* Herron, Marinc. & M. J. Wingf. isolates in *Pinus patula* seedlings in Colombia, while Latiffah *et al.* (2009) identified *F. solani* and *F. oxysporum* as the prevailing species in the soils of a forest area in Malasya, but did not determine the pathogenicity of the isolates.

Incidence a severity of the disease

In regard to the incidence of the disease, *F. oxysporum* isolate 1 had 100 % only in *P. pseudostrobus* 8 DAI, while *F. oxysporum* isolate 2 registered the same percentage during the same period for the two *Pinus* species. Likewise, *F. solani* had 100 % in both *Pinus* species 14 DAI (Table 1). This indicates that the *F. oxysporum* isolate 2 causes disease faster than the other isolates, due to a positive combination of initial intensity of the disease and an increase rate, while this was not the case with the other isolates, in which total infestation occurred less rapidly.



Cuadro 1. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en plántulas de *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham. y *Pinus pseudostrabus* Lindl. inoculadas con cinco aislados de *Fusarium oxysporum* Schltld., y un aislado de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Especie	Aislado	Incidencia inicial (%)	Incidencia final (%)	ABCPE (%· día)
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	66.6	100	1 099.2
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	33.3	100	1 299.9
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	33.3	100	799.5
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	33.3	100	699.6
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	33.3	100	999.6
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	66.6	100	1 299.6
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	66.6	100	1 399.8
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	33.3	100	1 299.9
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	33.3	100	899.7
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	33.3	100	899.4
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	33.3	100	999.6
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	33.3	100	699.9

Table 1. Area under the progress curve of the disease (AUDPC) in *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham. and *Pinus pseudostrabus* Lindl. seedlings inoculated with five *Fusarium oxysporum* Schltld. isolates and a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. isolate.

Species	Isolate	Initial incidence (%)	Final incidence (%)	AUDPC (%· day)
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	66.6	100	1 099.2
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	33.3	100	1 299.9
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	33.3	100	799.5
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	33.3	100	699.6
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	33.3	100	999.6
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	66.6	100	1 299.6
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	66.6	100	1 399.8
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	33.3	100	1 299.9
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	33.3	100	899.7
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	33.3	100	899.4
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	33.3	100	999.6
<i>Pinus pseudostrabus</i> Lindl.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	33.3	100	699.9

Al determinar la severidad de cada aislado de *Fusarium*, el de mayor valor fue el 1 de *F. oxysporum* en *P. pseudostrabus*, entretanto el aislado de 2 de *F. oxysporum* fue más virulento en *P. patula*, pues llegó a matar a los árboles a los 21 ddi. Asimismo, es importante destacar que el aislado de *F. solani* provocó lo mismo en las plántulas inoculadas en ambos pinos. Lo anterior coincidió con lo establecido por Lazreg *et al.* (2014) quienes identificaron a siete especies de *Fusarium* asociadas a plántulas de *P. halepensis*; definieron diferencias significativas en la longitud de brotes y de raíces, e índice de vigor en plántulas inoculadas con los diversos aislados; además, señalaron que *F. solani* sobresalió sobre otras especies del género, con respecto a la rapidez con la que colonizaron las raíces completas de los pinos inoculados.

When the severity of each *Fusarium* isolate was determined, *F. oxysporum* isolate 1 in *P. pseudostrabus* had the highest value, while the *F. oxysporum* isolate 2 was the most virulent in *P. patula*, having killed the trees 21 DAL. Furthermore, it should be emphasized that the *F. solani* isolate caused the same effect on the inoculated seedlings of both species. This agrees with the findings of Lazreg *et al.* (2014), who identified seven *Fusarium* species associated to *P. halepensis* seedlings, defined significant differences in shoot and root length and in the vigor index in seedlings inoculated with the various isolates; likewise, they pointed out that *F. solani* stood out from among the other species of the genus for the rapidity with which they colonized the complete roots of the inoculated pine trees.

El modelo logístico ($y = 1 / (1 + ((1-y_0) / y_0)^* \exp (-rL * t))$) fue el que mejor describió el progreso de los síntomas en ambas taxa de *Pinus*, con la presencia de los aislados de *Fusarium* evaluados a través del tiempo. Para el caso del aislado 2 de *F. oxysporum* en *P. pseudostrobus*, se observó que la intensidad inicial de la enfermedad fue mayor con respecto a *P. patula*, pero la velocidad de incremento de la severidad fue menor. Para el aislado de *F. solani*, las dos especies de pino mostraron una intensidad inicial de la enfermedad de 0.030 % y una tasa de incremento del porcentaje de severidad por día de 0.32 %. Por lo tanto, el aislado 2 de *Fusarium oxysporum* fue el más virulento, ya que registró un crecimiento de 0.397 % por día en comparación con el aislado de *F. solani*, el cual exhibió un crecimiento de 0.32 % por día (Cuadro 2). Esto es indicativo de que una mayor intensidad inicial de la enfermedad afecta el desarrollo de la misma; en el ABCPE, la intensidad inicial se relacionó con la cantidad de inóculo al tiempo 0, pero este inóculo aumentará según la tasa de incremento, el cual está sujeto, además, a la virulencia del patógeno y la especie de pino.

The logistic model ($y = 1 / (1 + ((1-l) / l) * \exp (-rL * t))$) was the one that best described the progression of symptoms in both pine species in the presence of the *Fusarium* isolates evaluated over time. In the case of isolate 2 of *F. oxysporum* in *P. pseudostrobus*, it was observed that the initial intensity of the disease was higher with respect to *P. patula*, but the speed of increase of severity was lower. For the *F. solani* isolate, the two species of pine showed an initial intensity of disease 0.030 % and a rate of increase of severity percentage of 0.32 per day. Therefore, the *Fusarium oxysporum* isolate 2 was the most virulent, as it grew 0.397 % per day compared to the *F. solani* isolate, which showed a growth of 0.32 % per day (Table 2). This is indicative that a higher initial intensity disease affects its development; in ABCPE, the initial intensity is related to the amount of inoculum at time 0, but this inoculum will increase as the rate of increase does, which is also subject to the virulence of the pathogen and to the pine species.



Cuadro 2. Ajuste de modelo logístico del progreso de la severidad de cinco aislados de *Fusarium oxysporum* Schltld. y un aislado de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. inoculados en plántulas de *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham. y *Pinus pseudostrobus* Lindl.

Especie	Aislado	Severidad inicial (%)	Severidad final (%)	y0	rL
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	13.3	100	0.0433	0.240
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	6.6	100	0.015	0.397
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	6.6	100	0.010	0.315
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	6.6	100	0.019	0.269
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	6.6	100	0.018	0.276
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	13.3	100	0.030	0.320
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	13.3	100	0.032	0.321
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	6.6	100	0.028	0.305
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	6.6	100	0.006	0.393
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	6.6	100	0.047	0.221
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	6.6	100	0.016	0.278
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	6.6	100	-0.001	0.63

Table 2. Adjustment of the logistic model of the progress of the severity of five *Fusarium oxysporum* Schltld. isolates and a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. isolate inoculated in *Pinus patula* Schiede ex Schltld. & Cham. and *Pinus pseudostrobus* Lindl. seedlings.

Species	Isolate	Initial severity (%)	Final severity (%)	y0	rL
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 1	13.3	100	0.0433	0.240
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 2	6.6	100	0.015	0.397
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 3	6.6	100	0.010	0.315
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 4	6.6	100	0.019	0.269
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld. 5	6.6	100	0.018	0.276
<i>Pinus patula</i> Schiede ex Schltld. & Cham.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	13.3	100	0.030	0.320

Continue Table 2...

Continue Table 2..

Especie	Aislado	Severidad inicial (%)	Severidad final (%)	y0	rL
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 1	13.3	100	0.032	0.321
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 2	6.6	100	0.028	0.305
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 3	6.6	100	0.006	0.393
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 4	6.6	100	0.047	0.221
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 5	6.6	100	0.016	0.278
<i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	6.6	100	-0.001	0.63

De manera similar, Herron *et al.* (2015) determinaron que diversos aislados de *Fusarium marasasanum*, *F. parvisorum* y *F. sororula* causaron enfermedad en plántulas de *Pinus patula*; además de que existió variación en la patogenicidad y virulencia entre aislados fúngicos del mismo taxon.

Conclusiones

De acuerdo a la combinación de datos de caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS y pruebas de patogenicidad, se demostró que *Fusarium solani* y *F. oxysporum* son las especies de hongos responsables de ocasionar los síntomas de pudrición de raíz y marchitez de plantas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* en Guerrero, México. Asimismo, no se observó diferencia entre la incidencia y severidad de la enfermedad causada por cinco aislados de *F. oxysporum* y un aislado de *F. solani*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución por autor

Leticia Robles Yerena: recolección de material vegetal, aislamiento de hongos, pruebas de patogenicidad en invernadero, toma de datos y redacción del manuscrito; Santos Gerardo Leyva Mir: recolección de material vegetal, definición del diseño experimental y revisión del manuscrito; Armando Cruz Gómez: purificación y caracterización morfológica de hongos; Moisés Camacho Tapia: extracción de ADN y amplificación por PCR; Daniel Nieto Ángel: recolección de material vegetal y aportación de material de laboratorio; Juan Manuel Tovar Pedraza: definición del estudio, análisis de secuencias de ADN y revisión del manuscrito.

Referencias

- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA. 218 p.
- Campbell, C. L. and L. V. Madden. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience. New York, NY, USA. 532 p.
- 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, USDA Forest Service, Natural Resources Canada, Conafor. Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx., México. 587 p.
- Dick, M. A. and K. Dobbie. 2002. Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. New Zealand Plant Protection 55: 58-62.

Similarly, Herron *et al.* (2015) determined that various *Fusarium* marasasanum, *F. parvisorum* and *F. sororula* isolates caused disease in *Pinus patula* seedlings; furthermore, they pointed out that there was a variation in the pathogenicity and virulence between fungal isolates of the same species.

Conclusions

Based on the combination of data of the morphological characterization, analysis of sequences of ITS regions and pathogenicity tests, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* were shown to be the fungal species that cause root rot and wilting of *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* plants in Guerrero, Mexico. Also, no differences were observed between the incidence and severity rates of the disease caused by five *F. oxysporum* isolates and a *F. solani* isolate.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Contribution by author

Leticia Robles Yerena: collection of vegetal materials, isolation of fungi, pathogenicity tests in the nursery, data collection and drafting of the manuscript; Santos Gerardo Leyva Mir: collection of vegetal materials, definition of the experimental design and revision of the manuscript; Armando Cruz Gómez: purification and morphological characterization of the fungi; Moisés Camacho Tapia: DNA extraction and amplification by PCR; Daniel Nieto Ángel: collection of vegetal materials and contribution of laboratory materials; Juan Manuel Tovar Pedraza: definition of the study, analysis of DNA sequences and revision of the manuscript.

End of the English version



- Dvorak, W. S., G. R. Hodge, J. E. Kietzka, F. Malan, L. F. Osorio and T. K. Stangen. 2000. *Pinus patula*. In: Conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE Cooperative. USA CAMCORE Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. 234 p.
- Gordon, T. R., C. L. Swett and M. J. Wingfield. 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Protection* 73: 28-39.
- Guerra, C., H. Cruz, I. Vila, A. Duarte y M. O. López. 2004. Principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* Morelet en Cuba. *Fitosanidad* 8(2): 9-12.
- Hassan D. G., M. A. Beig, F. A. Ahanger, N. A. Ganai and M. A. Ahangar. 2011. Management of root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in blue pine (*Pinus wallichiana*) through use of fungal antagonists. *Asian Journal of Plant Pathology* 5(2): 62-74.
- Herron, D. A., M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, C. A. Rodas, S. Marincowitz and E. T. Steenkamp. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology* 80: 131-150.
- Latiffah, Z., M. I. Padzilah, S. Baharuddin and Z. Maziah. 2009. *Fusarium* species in forest soil of Bird Valley. *Malaysian Journal of Microbiology* 5(2): 132-133.
- Lazreg, F., L. Belabid, J. Sánchez, E. Gallego and B. Bayaa. 2014. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with diseases of Aleppo-pine seedlings in Algerian forest nurseries. *Journal of Forest Science* 60(3): 115-120.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Wiley-Blackwell Publishing. Ames, IA, USA. 388 p.
- Lori, G. A. and M. I. Salerno. 2003. *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* and *Pinus elliottii* in Argentina. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110(5): 437-443.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 226 p.
- Ocamb, C. M. and J. Juzwik. 1995. *Fusarium* species associated with rhizosphere soil and diseased roots of Eastern white pine seedlings and associated nursery soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17: 325-330.
- Ocamb, C. M., J. Juzwik and F. B. Martin. 2002. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests* 24: 67-79.
- Perry, J. P. 2009. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, OR, USA. 234 p.
- Statistical Analysis Systems (SAS). 2011. *User's guide*. Version 9.3. Cary, NC, USA. 2323 p.
- Torres J. J. 2003. *Patología forestal*. Mundiprensa. Madrid, España. 270 p.
- White, T. J., T. Burns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. Gelfand, J. Sninsky and T. J. White (eds.), *PCR protocol: a guide to methods and application*. Academic Press, Inc., New York, NY, USA. pp. 315-322.

