

# HONGOS ASOCIADOS A EUCALIPTO, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid

## FUNGI ASSOCIATED TO EUCALYPTUS, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid

Omar A. Pérez-Vera<sup>1</sup>, María de J. Yáñez-Morales<sup>1</sup>, Dionicio Alvarado-Rosales<sup>1</sup>, David Cibrián-Tovar<sup>2</sup> y Silvia E. García-Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

<sup>2</sup>División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (alejandro11@terra.com)

### RESUMEN

En México se cultivan alrededor de 25 000 ha de eucalipto. Recientemente se encontró *Coniothyrium zuluense* en plantaciones de Tabasco, México. *Coniothyrium* es endofítico, y *C. zuluense* es un patógeno severo en Sudáfrica. El objetivo de este estudio fue aislar este hongo como latente en tallos sanos, lesiones foliares, y semillas. A mediados de 2002, en material proporcionado por la plantación PLANFOSUR en Veracruz, se muestrearon tallos sanos en árboles de seis clones, se examinó semilla de cuatro lotes, y se analizaron lesiones foliares de 15 árboles. Los hongos fueron aislados en cultivo puro, su identificación fue por morfología, y se caracterizaron molecularmente amplificando la región intergénica (ITS) de los genes ribosomales rADN mediante la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Del material muestreado no se aisló *C. zuluense*. Se aislaron 12 géneros fungosos: en tallos se encontró *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y *Trichoderma*; en lesiones foliares *Alternaria*, *Botrytis*, *Chaetomella*, *Colletotrichum*, *Penicillium* y *Pestalotiopsis*; de semilla *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Los análisis moleculares corroboraron las identificaciones, y las secuencias de nucleótidos obtenidas se depositaron en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se reporta, por primera vez en México, a *Chaetomella* y a los hongos aislados de semilla con *E. grandis*. No se descarta que *Coniothyrium zuluense* esté latente en tejidos o semillas de eucalipto.

**Palabras clave:** ITS-rADN, lesiones, semilla, tallos.

### INTRODUCCIÓN

En México existen 25 000 ha de eucalipto y su número se incrementa cada año. Las principales regiones productoras son Las Choapas, Veracruz y Huimanguillo, Tabasco, con 15 000 ha entre ambas. La producción de eucalipto se destina, entre otros usos, a fabricar papel. Las enfermedades fungosas que lo atacan se han incrementado (Crous *et al.*, 1998). En Brasil, Colombia, Estados Unidos, India y Sudáfrica se reporta que

Recibido: Abril, 2003. Aprobado: Febrero, 2005.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 39: 311-318. 2005.

### ABSTRACT

In México, approximately 25 000 ha of eucalyptus are planted. Recently, *Coniothyrium zuluense* was reported on eucalyptus plantations in the state of Tabasco, México. *Coniothyrium* is endophytic and *C. zuluense* is a severe pathogen in South Africa. The objective of this study was to isolate this fungus as latent in healthy stems, foliage lesions, and seeds. In the middle of 2002, materials produced by the PLANFOSUR plantation in the state of Veracruz, México, were sampled for fungi isolation. These materials included healthy stems from trees of six clones, seeds from four lots, and lesions from 15 trees. The fungi were isolated in pure culture and identified by morphology, and were molecularly characterized through amplification by Polymerase chain reaction (PCR) of the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal rDNA genes. *C. zuluense* was not isolated from the materials. Twelve fungi genera were isolated: from stems; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* and *Trichoderma*; from foliage lesions, *Alternaria*, *Botrytis*, *Chaetomella*, *Colletotrichum*, *Penicillium* and *Pestalotiopsis*; and from seed, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium* and *Penicillium*. Each identified fungus was also molecularly confirmed, and their nucleotide sequences were deposited in the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Thus, *Chaetomella*, and the seed fungi are reported for the first time in México associated with *E. grandis*. With respect to *C. zuluense*, it was not possible to insure that this fungus was not latent in tissues and seeds.

**Key words:** ITS-rDNA, foliage lesions, seed, stems.

### INTRODUCTION

In México, there exist 25 000 ha of eucalyptus, and its numbers increase each year. The principal regions of production are Las Choapas, Veracruz and Huimanguillo, Tabasco, with 15 000 ha between the two areas. The production of eucalyptus is destined to the paper industry, among other uses. The fungal diseases which attack it have increased (Crous *et al.*, 1998). In Brazil, Colombia, The United States, India and South Africa, it is reported that the diseases which most affect this crop are cankers induced by *Botryodiplodia*, *Cryphonectria* and *Fusicoccum*. In the United States, in

las enfermedades que más afectan a este cultivo son canchros inducidos por *Botryodiplodia*, *Cryphonectria* y *Fusicoccum*. En Estados Unidos, en 1996, se reportó una nueva enfermedad causada por *Coniothyrium zuluense* Wingfield, Crous & Coutinho, cuya sintomatología es la formación de canchros de color rojo oscuro y rotura de la corteza (Wingfield *et al.*, 1996). Su siembra se realiza con semilla importada de Australia y Sudáfrica (Cibrián, 2002)<sup>3</sup> lo que ha incrementado la incidencia de enfermedades (Cibrián *et al.*, 1999) como la causada por *C. zuluense*, recientemente diagnosticada en Tabasco (Roux *et al.*, 2001). Varias especies de *Coniothyrium* son endofíticas (Sinclair y Cerkauskas, 1996). Un hongo endofítico se encuentra dentro de los tejidos de la planta en todo su ciclo de vida sin causar destrucción de células, tejido, desbalance nutricional o químico, y sin formar ninguna estructura morfológica externa (Sinclair y Cerkauskas, 1996). Algunos hongos patógenos están latentes en tejidos sanos, y cuando las condiciones ambientales son propicias expresan sus síntomas (Bettucci y Saravay, 1993). Otros son latentes-saprobios, sus síntomas y fructificaciones se observan sólo en tejidos senescentes de la planta (Kirk *et al.*, 2001). Dada la poca información encontrada sobre este hongo en México, este estudio tuvo por objetivo aislar a *C. zuluense* de tallos sanos, lesiones foliares, y semillas de eucalipto. La hipótesis fue que este hongo se introdujo a México en forma latente en material vegetal o semilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tallos sanos

Se muestrearon 48 árboles de *E. grandis* de seis clones (ocho por clon): 94-002, 94-003, 94-005, 95-001, 95-002 y 95-004, donados por la plantación PLANFOSUR de las Choapas, Veracruz, México. De cada árbol de nueve meses de edad y 80 a 90 cm de altura, se tomó un tallo sano de una rama lateral apical, y cada uno se seccionó transversalmente en cuatro trozos de 1.0 cm de longitud.

### Lesiones foliares

Quince árboles de cinco clones (tres por clon; 94-002, 94-003, 94-005, 95-002 y 95-004) con follaje sano y vigoroso, se mantuvieron durante un mes en cámara húmeda entre 25 y 35 °C. Se muestrearon las hojas con diversas lesiones desarrolladas, y se realizaron observaciones de signos (estructuras morfológicas) del hongo, descripción de síntomas, y el aislamiento de éstos en cultivo puro.

### Semilla

En cuatro lotes de semilla (GG2 #25, GG2 #35, MF Select #25, y MF Select #35) de la plantación PLANFOSUR, se muestrearon al azar

1996, a new disease was reported caused by *Coniothyrium zuluense* Wingfield, Crous & Coutinho, whose symptomatology consists in the formation of dark red colored cankers and splitting of the bark (Wingfield *et al.*, 1996). It is spread from seed imported from Australia and South Africa (Cibrián *et al.*, 2002)<sup>3</sup> which has increased the incidence of diseases such as that caused by *C. zuluense*, recently diagnosed in Tabasco (Roux *et al.*, 2001). Several species of *Coniothyrium* are endophytic (Sinclair and Cerkauskas, 1996). An endophytic fungus is found within the tissues of the plant throughout its whole life cycle without causing destruction of cells, tissue, nutritional or chemical imbalance, and without forming any external morphological structure (Sinclair and Cerkauskas, 1996). Some pathogenic fungi are latent in healthy tissues, and when the environmental conditions are favorable, their symptoms are expressed (Bettucci and Saravay, 1993). Others are latent-saprobic, their symptoms and fructifications are observed only in senescent tissues of the plant (Kirk *et al.*, 2001). Given the little information found on this fungus in México, the objective of the present study was to isolate *C. zuluense* in healthy stems, foliar lesions, and seed of eucalyptus. The hypothesis was that this fungus was introduced into México in a latent form in plant material or seed.

## MATERIALS AND METHODS

### Healthy stems

A sampling was made of 48 trees of *E. grandis* of six clones (eight per clone): 94-002, 94-003, 94-005, 95-001, 95-002 and 95-004, donated by the PLANFOSUR plantation of Las Choapas, Veracruz, México. From each 9 month old tree and with a height of 80 to 90 cm, a healthy stem was taken from a lateral apical branch, and each one was cut transversally into four sections 1.0 cm in length.

### Foliage lesions

Fifteen trees of five clones (three per clone; 94-002, 94-003, 94-005, 95-002 and 95-004) with healthy and vigorous foliage, were maintained during one month in a moist chamber between 25 and 35 °C. Leaves with diverse developed lesions were sampled, and observations were made of signs (morphological structures) of the fungus, description of symptoms, and the isolation of these in pure culture.

### Seed

In four lots of seed (GG2 #25, GG2 #35, MF Select #25, and MF Select #35) from the PLANFOSUR plantation, 1200 seeds per lot were randomly sampled. The treatments analyzed were three (400 seeds per treatment): with disinfestation at 1.5%, and 5.0%, and without disinfestation.

<sup>3</sup> Cibrián, D. Comunicación personal.

1200 semillas por lote. Los tratamientos analizados fueron tres (400 semillas por cada uno): con desinfección a 1.5% y 5.0%; y sin desinfección.

### Desinfección e incubación

Todo el material fue desinfectado con hipoclorito de sodio comercial. Para tejido de hojas fue a 1.5%, para tallos y semillas fue además a 5.0% por tres y dos min de inmersión, respectivamente, lavados de tres a seis veces con agua destilada estéril, y secados posteriormente en papel estéril. El material se sembró en cajas Petri de plástico con medio de cultivo de Malta Extracto Agar (MEA: 10 g de extracto de malta, 20 g de agar, y 1000 ml de agua destilada). Las cajas se incubaron en luz negra continua con lámparas de 40 W, a temperatura de  $\pm 26$  °C. La cuantificación de hongos aislados se hizo a los 12 d en tallos y hojas, y a los 25 d en semillas.

### Identificación morfológica a género

De los aislamientos purificados en MEA se realizaron cultivos monospóricos en Agar Agua (AA: 18 g de agar en 1000 ml de agua destilada), e incrementaron en MEA. Los aislamientos de *Alternaria* se cultivaron en papa zanahoria agar (PCA) (PCA: 20 g de papa, 20 g de zanahoria, y 1000 ml de agua destilada), para observar la organización de sus conidios y conidióforos en el microscopio estereoscópico (Simmons, 1992). Para los estudios morfológicos se hicieron montajes permanentes en glicerol a 50% acidificado con HCl al 12N, para su observación al microscopio compuesto. Las claves usadas para las identificaciones a nivel de género fueron de Barnett y Hunter (1998), Ellis (1971), y Sutton (1980). Para su preservación los conidios se almacenaron en glicerol al 25% en ultracongelación a  $-85$  °C. Los aislamientos que no produjeron conidios libres se preservaron en tubos inclinados de MEA y se cubrieron con aceite mineral estéril.

### Caracterización molecular

De cada cultivo monospórico se extrajo el ADN con la técnica de Ahrens y Seemüller (1992), su calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Modelo Lambda Bio 10). Las regiones internas ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 5.8S-28S fueron amplificadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la combinación de iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ITS4 (TCCTCCGCTTATTGAT ATGC); o ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)/ITS4. La reacción de PCR por muestra estuvo compuesta por: agua estéril ionizada 12.145  $\mu$ l, ADN problema ajustado a 20 ng, 4  $\mu$ l; tampón 1X, 2.75  $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM, 1.375  $\mu$ l; mezcla de dNTP a 0.2 mM, 2.2  $\mu$ l; iniciadores a 10 pM, 1.1  $\mu$ l (por cada uno); y la Taq polimerasa a 1.5 Unidades, 0.33  $\mu$ l; en un volumen final de 25  $\mu$ l. El programa del termociclador Perkin Elmer (Modelo 2400) fue: desnaturalización inicial a 95 °C por dos min; 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión de 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 s, y 72 °C por 2 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto de PCR se

### Disinfestation and incubation

All of the material was disinfested with commercial sodium hypochlorite. For leaf tissue it was at 1.5%, for stems and seeds it was also at 5.0% for three and two min of immersion, respectively, they were washed from three to six times with sterile distilled water, and then dried on sterile paper. The material was planted in plastic Petri jars with Malt Extract Agar (MEA: 10 g of malt extract, 20 g agar, and 1000 mL of distilled water) culture medium. The jars were incubated in continuous black light with 40 W lamps at a temperature of  $\pm 26$  °C. The quantification of isolated fungi was made at 12 d in stems and leaves, and at 25 d in seeds.

### Morphological identification to genus

Of the isolations purified in MEA monosporic cultures were made in Agar Agar (AA: 18 g of agar in 1000 ml of distilled water), and increased in MEA. The isolations of *Alternaria* were cultivated in potato carrot agar (PCA) (PCA: 20g potato, 20 g carrot, and 1000 ml distilled water), to observe the organization of its conidia and conidiophores in the stereoscopic microscope (Simmons, 1992). For the morphological studies, permanent mounts were made in glycerol at 50% acidified with HCl at 12N, for observation under the compound microscope. The keys used for the identifications of genus were those of Barnett and Hunter (1998), Ellis (1971), and Sutton (1980). For their preservation, the conidia were stored in glycerol at 25% in ultrafreeze at  $-85$  °C. The isolations that did not produce free conidia were preserved in inclined MEA tubes and covered with sterile mineral oil.

### Molecular characterization

The DNA was extracted from each monosporic culture with the technique of Ahrens and Seemüller (1992), their quality was verified by electrophoresis in agarose gel at 0.8%, and quantified in a Perkin Elmer spectrophotometer (Model Lambda Bio 10). The internal regions ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacer) between the ribosomal genes (rDNA) 18S-5.8S and 5.8S-28S were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with the combination of primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ITS4 (TCCTCCGCTTATTGAT ATGC); or ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)/ITS4. The reaction of PCR per sample was composed of: sterile ionized water 12.145  $\mu$ l, DNA problem adjusted to 20 ng, 4  $\mu$ l; buffer 1X, 2.75  $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub> at 1.5 mM, 1.375  $\mu$ l; dNTP mixture at 0.2 mM, 2.2  $\mu$ l; primers at 10 pM, 1.1  $\mu$ l (for each one); and Taq polymerase at 1.5 units, 0.33  $\mu$ l; in a final volume of 25  $\mu$ l. The program of the Perkin Elmer thermocycler was: initial denaturalization at 95 °C for two min; 30 denaturalization cycles for one min; alignment and extension at 95 °C for one min, 50 °C for 30 sec, and 72 °C for two min; and a final extension at 72 °C for 10 min. The product of PCR was purified with the QUIAquick kit according to the specifications of the manufacturer, and they were sequenced in two directions (5' to 3', and 3' to 5') with the same ITS primers, and with an ABI 3700 automatic sequencer. The sequences of obtained nucleotides were analyzed with the software

purificó con el kit QIAquick según las especificaciones del fabricante, y fueron secuenciados en dos direcciones (5' a 3', y 3' a 5') con los mismos iniciadores ITS, y con un secuenciador automático ABI 3700. Las secuencias de nucleótidos obtenidos se analizaron con el paquete Lasergene 2001, Versión 5, de DNASTAR, Inc. (Anónimo, 2001), y se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nih.gov). Los valores cuantitativos generados por el Lasergene y los encontrados en el banco de datos que respaldaron el análisis se enlistan en el Cuadro 2. Las secuencias de estudio se depositaron en el NCBI.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tallos sanos

En ninguno se aisló a *C. zuluense*. Del tejido interno se aislaron e identificaron nueve hongos (Cuadro 1). En total, de los seis clones, el género que se encontró con mayor frecuencia fue *Alternaria* sp., seguido por *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., y *Trichoderma* sp., 25% cada uno. En menor porcentaje se encontraron *Aspergillus* sp., un mucoral; y de *Fusarium* sp. sólo se aisló una colonia. En total, de los tallos de cada clon se aislaron de cuatro a cinco hongos, y en algunos tallos no se aisló ninguno (Cuadro 1, Figura 1a). El aislamiento de estos hongos de tallos sanos indica su condición endofítica o latente, y es respaldado por otros estudios. En Uruguay todos estos hongos han sido reportados como endofíticos en xilema y corteza de plántulas de *E. grandis* (Bettucci y Saravay, 1993; Bettucci y Alonso, 1997). En Sudáfrica *Botryosphaeria dothidea* es endofítico en hojas y xilema de tallos de *E. grandis*. A esta especie y a *Pestalotiopsis neglecta* también se les conoce como

Lasergene 2001, Version 5, of DNASTAR, Inc. (Anonymous, 2001), and were compared with the sequences reported in the data base of the gene bank of the NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nih.gov). The quantitative values generated by Lasergene and those found in the bank of data that supported the analysis are listed in Table 2. The study sequences were deposited in the NCBI.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Healthy stems

*C. zuluense* was not isolated in any of the samples. Nine fungi from the internal tissue were isolated and identified (Table 1). In all, of the six clones, the genus that was found most frequently was *Alternaria* sp., followed by *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., and *Trichoderma* sp., 25% each one. A smaller percentage was found of *Aspergillus* sp., a mucoral; and of *Fusarium* sp. only one colony was isolated. In all, four to five fungi were isolated from the stems of each clone, and in some stems no fungus was isolated (Table 1, Figure 1a). The isolation of these fungi from healthy stems indicates their endophytic or latent condition, and is supported by other studies. In Uruguay, all of these fungi have been reported as endophytic in xylem and bark of seedlings of *E. grandis* (Bettucci and Saravay, 1993; Bettucci and Alonso, 1997). In South Africa, *Botryosphaeria dothidea* is endophytic in leaves and xylem of stems of *E. grandis*. This species and *Pestalotiopsis neglecta* are also known as pathogens. The former causes the death of eucalyptus trees (Smith *et al.*, 1996), and the latter of stems of *E. nitens* in Australia (Yuan and Mohammed, 1999).

**Cuadro 1. Porcentajes de hongos aislados de tallos sanos de seis clones de *E. grandis* en medio de cultivo malta extracto agar. Table 1. Percentages of fungi isolated from healthy stems of six clones of *E. grandis* in malt extract agar culture medium.**

Hongo aislado <sup>¶</sup>	Clones <sup>†</sup>						% TA <sup>p</sup>
	1 94002	2 94003	3 94005	4 95001	5 95002	6 95002	
<i>Alternaria</i> sp.	3.1	3.1	25.0	25.04	50.1	40.7	147.1
<i>Aspergillus</i> sp.	3.1	0	0	6.26	0	3.1	12.5
<i>Botryosphaeria</i> sp.	3.1	0	0	3.13	0	0	6.3
<i>Colletotrichum</i> sp.	3.1	3.1	0	0	15.6	3.1	25.0
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0	0	3.1	0	3.1
Mucoral	0	0	9.4	0	3.1	0	12.5
<i>Penicillium</i> sp.	0	6.3	0	0	3.1	0	9.4
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	3.1	21.91	0	0	25.0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	3.1	3.1	15.73	0	3.1	25.0
TG <sup>§</sup> :	4	4	4	5	5	4	9

<sup>†</sup> Tallos sanos desinfectados a 1.5, y 5.0% de hipoclorito de sodio ♦ Healthy stems disinfested at 1.5 and 5.0% sodium hypochlorite.

<sup>¶</sup> En 192 tallos sanos ♦ In 192 healthy stems.

<sup>§</sup> Total de géneros aislados por clon ♦ Total of genera isolated by clon.

<sup>p</sup> Porcentaje total acumulado en los seis clones ♦ Accumulated total percentage in the six clones.

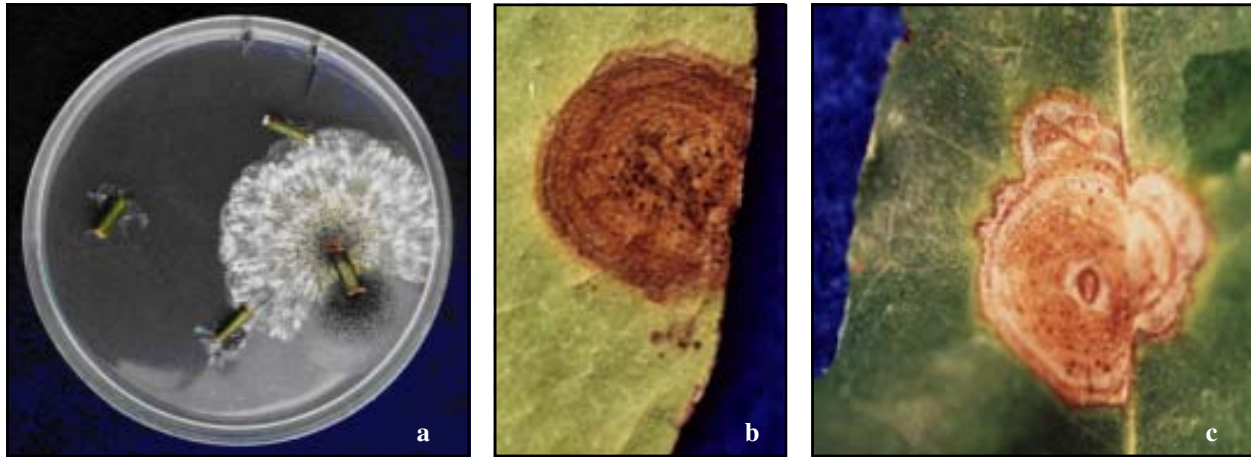


Figura 1. a) tallos sanos de eucalipto en cultivo malta extracto agar con colonias fungosas desarrolladas a ambos extremos a los 12 días de incubación. b) lesión foliar con múltiples acérvulos negros en círculos concéntricos y abundantes conidios de *Pestalotiopsis* sp. c) lesión con círculos tenues concéntricos de donde se aisló *Alternaria* sp.

Figure 1. a) healthy stems of eucalyptus in malt extract agar culture medium with fungal colonies developed at both ends at 12 days of incubation. b) foliar lesion with multiple black acervulae in concentric circles and abundant conidia of *Pestalotiopsis* sp. c) lesion with light concentric circles from which *Alternaria* sp. was isolated.

patógenos. La primera causa la muerte de árboles de eucalipto (Smith *et al.*, 1996), y la segunda en tallos de *E. nitens* en Australia (Yuan y Mohammed, 1999).

### Lesiones foliares

En ninguna muestra se aisló a *C. zuluense*. Las lesiones se agruparon de acuerdo con cuatro tipos de síntomas: necrosis de tejido apical (36.95%), lesiones circulares de 1.0 cm de diámetro con necrosis oscura (54.35%), necrosis clara con círculos concéntricos (4.35%), y lesiones necróticas claras de 0.6×0.8 cm de diámetro (4.35%). Los primeros dos tipos de lesiones formaron acérvulos negros dispersos en el haz, y el tercero los formó en círculos concéntricos (Figura 1b). La mayoría de las lesiones desarrollaron abundantes conidios de *Pestalotiopsis* sp., y sólo en una hubo signos de *Botrytis* sp. En total se aislaron seis hongos. *Alternaria* sp. en 46.37% (Figura 1c), *Botrytis* sp. en 48.62%, *Chaetomella* sp. en 18.75, *Colletotrichum* sp. en 17.68, *Penicillium* sp. en 5.36%, y *Pestalotiopsis* sp. en 127.35% (porcentajes acumulados). De los clones 94-005 y 95-004 se aisló el mayor número de géneros, cinco; y sólo uno del clon 94-002. Aunque no se aisló *C. zuluense* de lesiones, en Sudáfrica esta especie se ha reportado infectando hojas de eucalipto (Van Zyl *et al.*, 1997). En India, se ha encontrado *Alternaria alternata* en hojas de eucalipto (Bhat y Hegde, 1990). En México, específicamente en los estados de Nayarit y en el de Sinaloa, en plantaciones de eucalipto, se ha asociado la presencia de *Alternaria* sp., y *Pestalotiopsis* sp. con manchas foliares (Cibrián *et al.*, 1999). De *Pestalotiopsis*, en otros países, al menos cinco especies se han aislado en eucalipto (Bettucci y Saravay,

### Foliar lesions

*C. zuluense* was not isolated in any of the samples. The lesions were grouped according to four types of symptoms: necrosis of apical tissue (36.95%), circular lesions 1.0 cm in diameter with dark necrosis (54.35%) light necrosis with concentric circles (4.35%), and light necrotic lesions 0.6×0.8 cm in diameter (4.35%). The first two types of lesions formed black acervulae disperse on the fascicle, and the third formed them in concentric circles (Figure 1b). Most of the lesions developed abundant conidia of *Pestalotiopsis* sp., and only in one there were signs of *Botrytis* sp. In all, six fungi were isolated: *Alternaria* sp. in 46.37% (Figure 1c), *Botrytis* sp. in 48.62%, *Chaetomella* sp. in 18.75, *Colletotrichum* sp. in 17.68, *Penicillium* sp. in 5.36%, and *Pestalotiopsis* sp. in 127.35% (accumulated percentages). The greatest number of genera (five) was isolated from the clones 94-005 and 94-004, and only one from the clone 94-002. Although *C. zuluense* was not isolated from lesions, in South Africa this species has been reported infecting leaves of eucalyptus (Van Zyl *et al.*, 1997). In India, *Alternaria alternata* has been found in eucalyptus leaves (Bhat and Hegde, 1998). In México, specifically in the states of Nayarit and Sinaloa, in eucalyptus plantations, the presence of *Alternaria* sp. and *Pestalotiopsis* sp. has been associated with foliar spots (Cibrián *et al.*, 1999). As for *Pestalotiopsis*, in other countries, at least five species have been isolated in eucalyptus (Bettucci and Saravoy, 1993). Thus, it is inferred that the isolated fungi, with the exception of *Penicillium* and *Chaetomella*, are found latent in the healthy foliar tissue, and produced lesions when the trees were incubated in adequate

1993). Se infiere entonces que los hongos aislados, con excepción de *Penicillium* y *Chaetomella*, se encuentran latentes en el tejido foliar sano, y produjeron lesiones al incubarse los árboles en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. De todos estos hongos, al parecer *Chaetomella* sp. no se ha reportado en hojas de eucalipto.

### Semilla

De ninguna se aisló *C. zuluense*. Los hongos aislados fueron (en %): *Alternaria* sp., 0.75; *Aspergillus* sp., 0.75; *Chaetomium* sp., 0.5; *Cladosporium* sp., 15.5; y *Penicillium* sp., 10.75. En cada lote de semilla se aislaron dos o tres géneros. Los principales fueron *Cladosporium* sp., y *Penicillium* sp., y el menos aislado fue *Chaetomium* sp. Según Mittal *et al.* (1990), y Mohanan y Sharma (1991), ninguno de los hongos de este estudio se había reportado en semilla de eucalipto, aunque en semilla de soya son hongos latentes (Sinclair y Cerkauskas, 1996). A pesar de que *C. zuluense* no se aisló de tejidos y semillas, no se puede descartar la posibilidad que se encuentre en forma latente en eucalipto. Esto en base a que los otros hongos aislados fueron de crecimiento rápido, en contraste con *C. zuluense* que tiene un crecimiento lento, lo que posiblemente inhibió su desarrollo.

### Caracterización molecular

El producto de PCR:rADN-ITS fue de 600 pb (pares de bases). Las dos direcciones secuenciadas por aislamiento tuvieron 100% de similitud entre nucleótidos. Al comparar la secuencia de nucleótidos de cada aislamiento identificado morfológicamente en esta investigación con las secuencias reportadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), ésta correspondió al mismo género (Cuadro 2), con el más alto valor de identidad. Esto corroboró la identificación morfológica. Cada secuencia se depositó en el banco de genes y se obtuvo su número de acceso (Cuadro 2).

En general, estos estudios deben considerarse al importar material vegetal, por ser esta una forma de introducir a otras regiones nuevas enfermedades, o razas de algún patógeno en estado latente. Los resultados obtenidos evidencian el riesgo potencial de la introducción o movimiento de plantas sanas sin un análisis adecuado de la posible micoflora asintomática involucrada.

### CONCLUSIONES

No se aisló *C. zuluense* en tallos sanos, lesiones foliares, y semillas. Se aislaron otros 12 géneros asociados, y su identificación se reconfirmó por análisis

conditions of temperature and humidity. Of all these fungi, apparently *Chaetomella* sp. has not been reported in eucalyptus leaves.

### Seed

*C. zuluense* was not isolated from any of the seeds. The isolated fungi were (in %): *Alternaria* sp., 0.75; *Aspergillus* sp., 0.75; *Chaetomium* sp., 0.5; *Cladosporium* sp., 15.5; and *Penicillium* sp., 10.75. In each seed lot, two or three genera were isolated. The principal were *Cladosporium* sp., and *Penicillium* sp., and the least isolated was *Chaetomium* sp. According to Mittal *et al.* (1990), and Mohanan and Sharma (1991), none of the fungi of this study had been reported in eucalyptus seed, although they are latent fungi in soybean seed (Sinclair and Cerkauskas, 1996). Although *C. zuluense* was not isolated in tissue and seed, the possibility that it is present in a latent form in eucalyptus can not be discarded. This is because the other isolated fungi were of rapid growth, whereas *C. zuluense* has slow growth, which may have inhibited its development.

### Molecular characterization

The product of PCR:rDNA-ITS was 600 pb (pairs of bases). The two directions sequenced through isolation had 100% similarity between nucleotides. When comparing the nucleotide sequence of each morphologically identified isolation in this investigation with the sequences reported in the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), it corresponded to the same genus (Table 2), with the highest identity value. This confirmed the morphological identification. Each sequence was deposited in the gene bank and its access number was obtained (Table 2).

In general, these studies should be considered when plant material is imported, as it is a form of introducing new diseases or races of a pathogen in a latent stage to other regions. The results obtained show the potential risk of the introduction or movement of healthy plants without an adequate analysis of the possible asymptomatic micoflora involved.

### CONCLUSIONS

*C. zuluense* was not isolated in healthy stems, foliar lesions, or seeds. However, 12 other associated genera were isolated, and their identification was confirmed through molecular analysis. *Chaetomella* sp., and all of the fungi in seed, are reported for the first time in México associated with eucalyptus.

—End of the English version—

**Cuadro 2. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS<sup>†</sup>) de los genes rADN de los hongos aislados de eucalipto.****Table 2. Molecular characterization by alignment of the sequences reported in the gene bank with the intergenic sequences (ITS<sup>†</sup>) of the rDNA of the fungi isolated from eucalyptus.**

Hongo aislado <sup>¶</sup>	Tejido	N <sup>§</sup>	Núm. de acceso <sup>p</sup>	Banco de Genes <sup>b</sup>			
				Especie alineada	MVA <sup>α</sup>	IS <sup>††</sup>	Núm. de acceso
<i>Alternaria</i> sp.	Hoja	549	AY558895	<i>Alternaria</i> sp.	1088	100	AY154694
<i>Alternaria</i> sp.	Semilla	549	AY755609	<i>A. tenuissima</i>	1047	100	AY154712
<i>Alternaria</i> sp.	Tallo'	538	AY755607	<i>A. tenuissima</i>	1047	100	AY154712
<i>Alternaria</i> sp.	Tallo'	516	AY755608	<i>A. tenuissima</i>	1029	100	AY154712
<i>Aspergillus</i> sp.	Tallo'	554	AY755615	<i>Aspergillus tubingensis</i>	1057	100	AJ280008
<i>Botrytis</i> sp.	Hoja	517	AY550976	<i>B. cinerea</i>	954	100	Z73765
<i>Chaetomella</i> sp.	Hoja	439	AY558894	<i>Chaetomella</i> sp.	870	100	AJ301961
<i>Chaetomium</i> sp.	Semilla	545	AY560520	<i>Chaetomium globosum</i>	1084	99.5	AY429056
<i>Cladosporium</i> sp.	Semilla	514	AY755616	<i>C. tenuissimum</i>	1019	100	AF393724
<i>Colletotrichum</i> sp.	Hoja	539	AY561499	<i>Glomerella cingulata</i> ( <i>C. gloeosporioides</i> )	1092	100	AY266389
<i>Fusarium</i> sp.	Tallo'	532	AY755617	<i>Fusarium</i> sp.	1015	99.1	AF178404
<i>Penicillium</i> sp.	Semilla	506	AY755612	<i>Penicillium citrinum</i>	946	100	AY373904
<i>Penicillium</i> sp.	Semilla	495	AY755613	<i>P. corylophilum</i>	981	100	AY373906
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Hoja	522	AY755611	<i>Pestalotiopsis clavisporea</i>	975	99.4	AY682929
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Hoja	516	AY755610	<i>P. clavisporea</i>	957	99.4	AY687304
<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo	579	AY755614	<i>T. longibrachiatum</i>	1148	100	AY328040

<sup>†</sup> Internal Transcribed Spacer (siglas en inglés) ✦ Internal Transcribed Spacer (initials in english).

<sup>¶</sup> Género representativo de los hongos identificados en eucalipto. 'Sano ✦ Representative genus of the fungi identified in eucalyptus. 'Healthy.

<sup>§</sup> Número de nucleótidos amplificado por PCR:ITS con los iniciadores ITS1-ITS4/ITS4-ITS5 ✦ Number of nucleotides amplified by PCR:ITS with the primers ITS1-ITS4/ITS4-ITS5.

<sup>p</sup> Base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) del internet ✦ Database of the NCBI.

<sup>α</sup> Máximo valor generado por el programa Lasergene, por comparación entre la secuencia de estudio y la de la base de datos del NCBI ✦ Maximum value generated by the Lasergene program, by comparing the study sequence and that in the NCBI database.

<sup>††</sup> Índice de similitud entre la secuencia del hongos aislado y la especie comparada ✦ Similarity index between the sequence of the isolated fungus and the compared species.

moleculares. *Chaetomella* sp., y todos los hongos en semilla, se reportan por primera vez en México asociados con eucalipto.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio formó parte del proyecto CONACYT 38409-V (Biodiversidad de hongos fitopatógenos y saprofitos en algunas regiones de México por análisis morfológicos y moleculares).

#### LITERATURA CITADA

Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Anónimo. 2001. Lasergene. Expert Sequence Analysis Software. User's Manual. Version 5. DNASTAR, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 475 p.

Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Bettucci, L., and R. Alonso. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycol. Res.* 101 (9): 1060-1064.

Bettucci, L., and M. Saravay. 1993. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. *Mycol. Res.* 97 (6): 679-682.

Bhat, M. N., and R. K. Hegde. 1990. New records of fungi on *Eucalyptus citriodora* and *Populus deltoides* from India. *Indian Forester* 116 (9): 759-760.

Cibrián, T. D., R. C. Bolaños., J. T. Méndez M., y S. G. Díaz. 1999. Diagnóstico Fitosanitario de las Plantaciones de Eucalipto y Melina en Nayarit y Sur de Sinaloa. Plantaciones Industriales Mexicanas S.A. de C. V. UACH. División de Ciencias Forestales (DICIFO). Ed. UACH. Chapingo, México. 135 p.

Crous, P., M. J. Wingfield., C. Mohammed, and Y. Z. Qing. 1998. New foliar pathogens of *Eucalyptus* from Australia and Indonesia. *Mycol. Res.* 102 (5): 527-532.

Ellis, M. B. 1971. Dematiaceae hyphomycetes. CAB International. Kew, Surrey, England. UK. 608 p.

Kirk, P. M., P. F. Cannon., J. C. David, and J. A. Stalpers. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th. Ed. CABI. London, UK. 655 p.

Mittal, R. K., R. L. Anderson, and S. B. Mathur. 1990. Microorganisms Associated with Tree Seeds: World Checklist 1990. Petawawa National Forestry Institute, Information Report PL-X-96, Forestry. Canada. 86 p.

Mohan, C., and J. K. Sharma. 1991. Seed pathology of forestry tree species in India: present status, practical problems and future prospects. *Commonwealth Forestry Review* 70: 133-151.

Roux, J., M. J. Wingfield, and D. Cibrián. 2001. First report of *Coniothyrium* canker of *Eucalyptus* in México. *Plant Dis.* 4 (8): 133-138.

Simmons, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy: Current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Vol III. Topics in Secondary Metabolism. Chelkowski, J., and A. Visconti (eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam. pp: 1-35.

- Sinclair, B., and R. F. Cerkaskas. 1996. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. *In*: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology and Evolution. Chapter I. Redlin, S. C., and L. M. Carris. (eds). APS, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 3-29.
- Smith, H., M. J. Wingfield, and O. Petrini. 1996. *Botryosphaeria dothidea* endophyte in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. *Plant Dis.* 89 (1): 189-195.
- Sutton, C. B. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. UK. 696 p.
- Van Zyl, L. M., M. J. Wingfield, and T. A. Coutinho. 1997. Diversity among isolates of *Coniothyrium zuluense*. A newly recorded *Eucalyptus* stem pathogen in South Africa. Proceedings of IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus*. Salvador, Bahia, Brazil.
- Wingfield, M. J., P. M. Crous, and A. C. Teresa. 1996. A serious cankers disease of *Eucalyptus* in South Africa caused by a new species of *Coniothyrium*. *Mycopathologia* 136 (3): 139-145.
- Yuan, Z. Q., and C. Mohammed. 1999. Pathogenicity of fungi associated with stem cankers of *Eucalyptus* in Tasmania, Australia. *Plant Dis.* 83 (11): 1063-1069.