

Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium sp.* obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) con malformación en Michoacán

Isaí Betancourt-Resendes, José F. Gonzaga-Espíritu, Sylvia Patricia Fernández-Pavía y Gerardo Rodríguez-Alvarado*

Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, 58880.

Resumen

La enfermedad malformación es uno de los factores principales que reducen la producción del mango en el ámbito mundial. Varias especies del hongo *Fusarium* causan esta enfermedad. En Michoacán se ha detectado una especie nueva de *Fusarium* causando la enfermedad. Aun cuando se han realizado estudios filogenéticos, la diversidad poblacional de este nuevo patógeno es desconocida. La determinación de los Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV) es una herramienta utilizada para estudiar la variabilidad genética de poblaciones de hongos mitospóricos. Para identificar GCVs se utilizan mutantes auxotrófos nit en pruebas de complementación. Los mutantes nit surgen espontáneamente cuando el hongo se inocula en medio que contenga nitrato y clorato de potasio. Estos mutantes no pueden utilizar nitrato (NO₃) como fuente de nitrógeno debido a una mutación estructural del gen *nit1* o en los loci que codifican para un cofactor que es parte de las enzimas nitrato reductasa y purina deshidrogenasa. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la frecuencia de generación de mutantes, caracterizarlos fenotípicamente y determinar los grupos de compatibilidad vegetativa en aislamientos de *Fusarium* obtenidos de mango con malformación. La frecuencia de generación de sectores de micelio resistentes en medio mínimo más clorato al 2% entre los aislamientos fue variable, 40%-94.4%. El 65.5% del total de todos los sectores generados produjeron mutantes nit, siendo el tipo *nit1* el más frecuente (55.5%). Los mutantes tipos *nit3* y *NitM* se produjeron en similar proporción. Todos los aislamientos analizados produjeron mutantes; sin embargo, el tipo y número de mutantes varió entre los aislamientos, característica que también ha sido observada en otras especies de *Fusarium*. Se detectaron dos grupos de compatibilidad en estos aislamientos lo cual indica una baja diversidad genética en las poblaciones de *Fusarium sp.* causantes de malformación del mango en Michoacán.

Palabras clave: *compatibilidad, nitrógeno, anastomosis, hongos*

Abstract

The disease mango malformation is one of the main factors that affect production in this crop worldwide. Several *Fusarium* species cause this disease. A new *Fusarium* taxon causing mango malformation has been detected in Michoacán. Although, phylogenetic studies have been carried out, studies on the variability in the populations of this new pathogen are lacking. Determining Vegetative Compatibility Groups (VCG) is a useful tool for the study of genetic variability in populations of mitosporic fungi. Auxotroph nit mutants are used in complementation tests to identify VCGs. nit mutants occur spontaneously when the fungus is grown on media containing nitrate and potassium chlorate. These mutants are unable to use nitrate as a nitrogen source due to a structural mutation on the *Nit1* gene or in the loci coding for a cofactor involved in the functionality of nitrate reductase and purine dehydrogenase. The objectives of this work were to determine the frequency of generation of mutants, characterize its phenotypes and determine compatibility groups of *Fusarium* isolates obtained from mango with malformation. The frequency of generation of resistant sectors of mycelia on minimum medium plus 2% chlorate among the isolates varied from 40 to 94.4%. Mutants nit were obtained from 65.5% of the sectors generated, with a majority being mutants type *nit3*. Mutants type *nit1* and *NitM* were obtained in a similar proportion. All the isolates analyzed produced mutants; however, the type and number of mutants varied among the isolates, characteristic that has also been detected in other *Fusarium* species. The results obtained indicate that populations of *Fusarium sp.* causing mango malformation in Michoacán, are amendable to diversity studies using Vegetative Compatibility Groups analysis.

Keywords: *compatibility, nitrogen, anastomosis, fungi*

Introducción

El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece a la familia Anacardaceae. Su fruto es comercialmente muy importante en países con áreas tropicales y subtropicales (Steenkamp *et al.*, 2000). México es uno de los principales productores en el mundo, siendo el principal exportador de mango a nivel mundial. Los estados con mayor producción de mango son: Sinaloa, Nayarit,

Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y parte de Chiapas (Prieto *et al.*, 2005). Sin embargo, la producción del mango puede verse afectada por la enfermedad malformación o también conocida como “escoba de bruja”. Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de tejido malformado en brotes florales y vegetativos (Zheng & Ploetz, 2002). La malformación del mango tiene una distribución pantropical habiéndose reportado en Asia, África y

*Autor de correspondencia: Gerardo Rodríguez-Alvarado, gra.labpv@gmail.com

América. En México, la enfermedad fue reportada por primera vez en Morelos, posteriormente en otros estados como Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Tamaulipas, Sinaloa, Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Baja California Sur y Sonora (Guzmán, 2004).

En la malformación floral las inflorescencias afectadas presentan los ejes primarios y secundarios acortados, engrosados y muy ramificados, se incrementa el número de flores masculinas, las cuales son más grandes de lo normal. Las flores hermafroditas que se producen son estériles, o si son fertilizadas abortan al poco tiempo por lo que no producen frutos, y como consecuencia reducen la producción (Salazar-García, 1995).

La malformación vegetativa se presenta con más frecuencia en las plantas jóvenes, aunque también puede aparecer en árboles maduros (Steenkamp *et al.*, 2000). Los síntomas se presentan en las yemas vegetativas de las axilas de las hojas o en los ápices de las plántulas. Los brotes afectados son deformados y presentan entrenudos acortados. Las hojas que se desarrollan son muy pequeñas, delgadas y quebradizas, plegándose hacia el tallo que las soporta (Salazar-García, 1995).

Diversas especies de *Fusarium* causan la malformación del mango (Steenkamp *et al.*, 2000; Zheng & Ploetz, 2002; Marasas *et al.*, 2006). La especie *Fusarium mangiferae* se ha detectado en **África del Sur, Egipto, Florida (EUA), Israel y Malasia. Mientras que** la especie *F. sterilihyphosum* se ha detectado en África del Sur y Brasil (Zheng & Ploetz, 2002). Recientemente, en Brasil (Lima *et al.*, 2008) y Michoacán, México (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008), se han detectado otros dos taxones de *Fusarium* causantes de la malformación del mango. Estos dos nuevos taxones son diferentes genéticamente a *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* pero similares morfológicamente a ambos.

Uno de los métodos para estudiar la diversidad genética en *Fusarium* es determinar los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) presentes entre los miembros de una población de aislamientos (Correll *et al.*, 1987). Se considera que dos aislamientos de una especie de *Fusarium* son compatibles vegetativamente cuando sus hifas se fusionan (anastomosis) formando heterocariones estables, por lo que ambos aislamientos pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa (Leslie & Summerell, 2006). El número de loci que controlan la habilidad de complementación fisiológica entre los aislamientos es de 10 a 15. Aislamientos que pertenecen al mismo GCV se consideran poblaciones clonales que comparten diferentes alelos de ciertos loci que les conceden características fisiológicas y patológicas similares, así como poseer un mismo origen geográfico (Swift *et al.*, 2002). Entre otras aplicaciones de los GCV es que permiten distinguir entre especies y formas especiales (Correll *et al.*, 1987).

Una de las estrategias para identificar GCV, es generar mutantes auxotrófos en la ruta metabólica de asimilación de nitrato (*nit*) y forzarlos a formar heterocariones que restauren la capacidad original (prototrófica) de utilización de diversas fuentes de nitrógeno. Esta vía de asimilación de nitrógeno en *Fusarium* comienza con la captación de nitrato, seguida de la reducción de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa; posteriormente el nitrito sufre una reducción más por la enzima nitrito reductasa hasta formar amonio (Crawford & Arst, 1993). Mutantes de *Fusarium* de esta ruta metabólica surgen espontáneamente cuando este hongo es cultivado en medio con

KClO₃, un compuesto análogo de NaNO₃. Los mutantes se reconocen porque presentan crecimiento micelial no denso en un medio mínimo que contenga nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. En medio mínimo que contenga amonio como fuente de nitrógeno, los mutantes presentarán crecimiento denso, al igual que el tipo silvestre. Pueden generarse diversos tipos de mutantes. El tipo de mutante *nit1* presenta cambios en el gen *nit1*, el cual codifica para la enzima nitrato reductasa, por lo que no pueden utilizar NO₃ como fuente de nitrógeno. Otro tipo de mutación ocurre en los loci (\approx 5 genes) que codifican para un cofactor que es parte de las enzimas nitrato reductasa y purina deshidrogenasa. Estos mutantes se denominan NitM, los cuales no pueden utilizar NO₃ ni hipoxantina como fuentes de nitrógeno. Un tercer tipo de mutante denominado *nit3* posee modificaciones en un gen que codifica una proteína reguladora de la vía de asimilación del nitrato, por lo que no pueden utilizar nitrato y nitrito como fuentes de nitrógeno (Leslie & Summerell, 2006).

En pruebas de autocompatibilidad entre mutantes *nit1* y NitM de un mismo aislamiento, la formación de micelio denso en el punto de crecimiento donde ambas colonias se juntan indicará que dicho aislamiento tiene la habilidad de anastomosarse, o en otras palabras es un aislamiento autocompatible. En pruebas de compatibilidad entre mutantes de diferentes aislamientos de un mismo taxon, si ocurre la formación de micelio denso en el punto de contacto de las dos colonias miceliales, indicará que ambos aislamientos son compatibles vegetativamente. En este caso, se habrá restablecido la característica prototrófica del micelio heterocarion generado por la anastomosis de las hifas de ambos mutantes, debido a que los aislamientos pertenecen al mismo GCV (Leslie & Summerell, 2006). Si no hay formación de micelio denso, entonces ambos aislamientos pertenecen a diferentes GCVs.

El análisis de los GCVs de especies de *Fusarium* es una herramienta útil para conocer la variabilidad genética de poblaciones de este hongo. Además, permite determinar si existe reproducción sexual en dichas poblaciones. Lo anterior tiene implicaciones en el establecimiento de programas de control y manejo de la enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la frecuencia de generación de mutantes, caracterizarlos fenotípicamente y determinar los grupos de compatibilidad de aislamientos de *Fusarium* obtenidos de mango con malformación.

Materiales y métodos

Aislamientos de Fusarium

Se analizaron 14 aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de mango procedentes de huertas de las localidades (municipio) de Buena Vista (Buena Vista), Minitas (Nueva Italia), Gambaro (Nueva Italia), Corondiro (Nueva Italia), El Tejaban (Nuevo Urecho), Mirador (Nuevo Urecho), Nuevo Urecho (Nuevo Urecho) e Ibérica (Nuevo Urecho), en Michoacán en el año 2004. Dichos aislamientos fueron purificados por medio de cultivos monospóricos y se almacenaron en glicerol 25% a -70 °C (Valente-Morales, 2006). La patogenicidad de estos aislamientos en mango ha sido demostrada previamente (Rodríguez-Alvarado

et al., 2008). Los aislamientos se identifican por el código Mexmi.

Preparación de medios de cultivo

Se siguieron las instrucciones de Leslie & Summerell (2006) para la preparación de medios de cultivo. Los medios de cultivo se disolvieron en el horno de microondas y posteriormente se esterizaron en una autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Posteriormente se colocaron en baño María a 49 °C, hasta que el medio se estabilizó a esa temperatura. Finalmente se vació en cajas Petri en una campana de flujo laminar. Las cajas Petri con medio se etiquetaron y almacenaron en bolsas de plástico hasta su uso.

PDA (papa dextrosa agar)

Se disolvieron 9.75 g de PDA deshidratado (DB Bioxon[®]) en 250 ml de agua destilada. Después de esterilizarlo, el medio se vació en cajas Petri 60 x 15 mm, las cuales se almacenaron a 25° C durante 2-4 días antes de usarlas.

Medio basal

Para preparar un litro de medio se utilizó 1 g de fosfato de potasio monobásico, 0.5 g de sulfato de magnesio hepta-hidratado, 0.5 g de cloruro de potasio, 0.2 ml de una solución de elementos, 2 g de nitrato de sodio, 30 g de sacarosa, 20 g de agar bacteriológico. La solución de elementos se preparó disolviendo en 100 ml de agua destilada los siguientes compuestos: 5 g de ácido cítrico, 5 g de Zn SO₄ 6H₂O, 1 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, 250 mg de CuSO₄ 5H₂O, 50 mg de MnSO₄, 50 mg de ácido bórico y 50 mg de Na₂MoO₄ 2H₂O.

Medio Mínimo (MM)

Se utilizaron los mismos compuestos y cantidades que para el medio basal, agregándose adicionalmente 0.5 g de nitrato de sodio (NaNO₃).

Medio mínimo + clorato

Para 250 ml de este medio se preparó inicialmente medio MM y se agregaron 0.4 g de L-asparagina y 5 g de KClO₃ (2%). Se vació en cajas Petri 100 x 15 mm las cuales se almacenaron a 25 °C por 24 horas antes de usarlas.

Medios para la caracterización fenotípica

Para la caracterización de mutantes *nit*, se utilizó el medio basal suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno por separado: tartrato de amonio 1.6 g, nitrato de sodio 2 g, nitrito de sodio 0.5 g e hipoxantina 0.2 g.

Preparación del inóculo

Se inocularon 25 µl de una suspensión de conidios de cada uno de los aislamientos, los cuales fueron obtenidos de cultivos monospóricos y almacenados en glicerol 25% a -70 °C, en cajas con medio PDA. Los cultivos se incubaron a 25° C hasta obtener un crecimiento micelial abundante (7-10 días). Se utilizaron 3-4 cajas por aislamiento.

Inoculación de discos en medio mínimo + clorato

A partir de las cajas de Petri con inóculo de cada aislamiento se

tomaron discos de 3 mm³ de diámetro. Tres discos se colocaron en cada caja con medio MM + clorato, equidistantes unos de otros, formando un triángulo equilátero. Las cajas con los discos se incubaron a 25 °C bajo luz negra y blanca constante. Los cultivos se revisaron diariamente para detectar la formación de sectores resistentes a clorato.

Transferencia de sectores

Los sectores de micelio resistentes al clorato se transfirieron a medio MM y se incubaron a 25 °C. La transferencia de sectores se llevó a cabo durante cinco días consecutivos a partir del cuarto día de incubación.

Caracterización de mutantes *nit*

Para la caracterización de los mutantes *nit* se utilizó medio MM suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno, nitrato, nitrito, hipoxantina y amonio. Los resultados se analizaron en base a la información indicada en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Caracterización fenotípica de mutantes *nit* de aislamientos de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en Michoacán.

Tipo de mutante	Fuentes de nitrógeno			
	NH ₄	NO ₃	NO ₂	Hipoxantina
Silvestre, no mutante	+	+	+	+
nit1	+	-	+	+
nit3	+	-	-	+
NitM	+	-	+	-

- Crecimiento micelial no denso
+ Crecimiento micelial denso

Pruebas de auto-compatibilidad

Mutantes *nit* (NitM y *nit1*) de un mismo aislamiento se complementaron en medio mínimo con NO₃ como la única fuente de nitrógeno. Discos de 1 mm de medio y micelio de cada mutante fueron colocados en cajas Petri 100 x 15 mm con el medio indicado. Los discos se colocaron separados aproximadamente 4 cm. Los cultivos se incubaron a 25 °C. Si hay formación de micelio denso en la línea de contacto entre los micelios de ambos mutantes, se considera que ocurre complementación. Lo anterior indica que dicho aislamiento tiene la facultad de formar un heterocarion prototrófico. A estos aislamientos se les denomina heterocariones auto compatibles (HSC, heterocarion self-compatible). Si no ocurre la formación de micelio denso, se considera que dicho aislamiento no tienen la facultad de formar heterocarion con otros aislamientos. A este tipo de aislamientos se les denomina heterocariones auto incompatible (HSI, heterocarion self-incompatible), por lo tanto se descartaron de análisis posteriores (Leslie y Summerell, 2006).

Pruebas de compatibilidad

Mutantes *nit* (NitM y *nit1*) de cada aislamiento se utilizaron en pruebas de complementación entre los aislamientos en medio mínimo con NO₃ como la única fuente de nitrógeno. El procedimiento fue similar al descrito en la sección anterior.

Resultados

Frecuencia de generación de sectores

Los aislamientos de *Fusarium* iniciaron la generación de sectores de micelio tres días después de la inoculación en medio MM con clorato. Los 14 aislamientos analizados en este estudio generaron 168 sectores de micelio resistentes a clorato a partir de 228 discos (Figura 1). El rango de frecuencia de generación de sectores entre los aislamientos fue de 40% a 94.4% (Cuadro 2). Los aislamientos Mexmi-15 y Mexmi-19 tuvieron una generación de sectores de más del 90%, mientras que en el porcentaje más bajo se ubicó el aislamiento Mexmi-10. El promedio de generación de sectores del resto de los aislamientos fue de 72.8%.

Porcentaje de mutantes nit

Sectores de micelio generados se transfirieron a cajas con medio mínimo, en donde se observó el tipo de crecimiento micelial (Figura 2). Solamente el 65.5% de los sectores transferidos mostraron un crecimiento micelial no denso por lo que se consideraron como mutantes *nit* (Cuadro 2). El resto de los sectores transferidos produjeron micelio denso. Algunos de los mutantes produjeron micelio denso en zonas de la colonia en medio MM. Se consideró que estos mutantes presentaban una mezcla de micelio mutado y silvestre en algunas partes de la colonia micelial (Figura 3). En estos casos, se realizó un intento de recuperación del mutante, haciendo una transferencia del micelio no denso a una caja nueva con medio MM. Si el micelio denso era recurrente, se descartaba dicho mutante.

Caracterización fenotípica de mutantes nit

Los mutantes obtenidos se caracterizaron en medio MM suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno (Figura 4). Los resultados indicaron que el 56.2% de los mutantes fueron del tipo *nit1*, el 26.6% *nit3* y el 16.2% de los mutantes fueron del tipo NitM (Cuadro 3). El aislamiento Mexmi-3 produjo tres mutantes que presentaron crecimiento no denso en medios suplementados con NO₃, NO₂ e hipoxantina como fuentes de nitrógeno (Figura 5).

Pruebas de complementación

En los casos de complementación vegetativa entre los aislamientos, se observó la formación de micelio denso en el lugar de contacto de las hifas. La ausencia de formación de una línea de crecimiento denso de micelio indicó que ocurrió incompatibilidad. Se detectaron dos grupos de compatibilidad vegetativa entre los aislamientos analizados (Cuadro 4). Aislamientos en un mismo grupo de compatibilidad vegetativa fueron capaces de formar heterocariones prototrófico. Cuatro aislamientos probados en este estudio pertenecieron a un mismo grupo (GCV I). Mientras dos aislamientos formaron otro grupo (GCV II). Se observaron diferencias entre los aislamientos de un mismo grupo en su capacidad para formar micelio heterocarion; algunos aislamientos formaron abundante micelio denso en la línea de contacto (Figura 6), mientras que otros aislamientos formaron líneas de micelio heterocarion poco prominentes. El aislamiento MexMi-5 no fue agrupado en uno de los GCVs debido a que no se obtuvieron mutantes NitM.

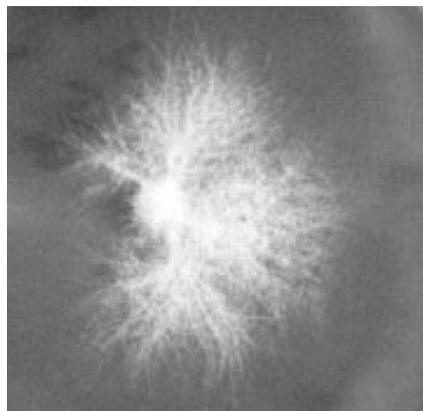


Figura 1. Formación de sector de micelio resistente en medio mínimo mas clorato.

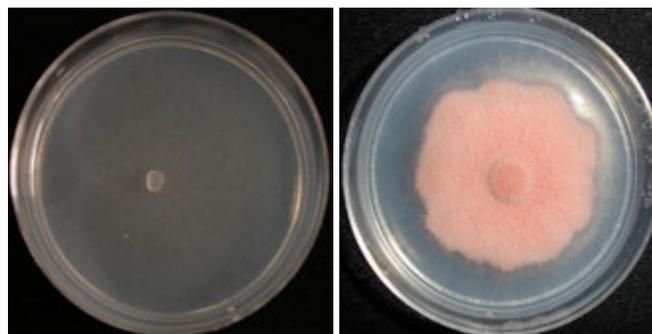


Figura 2. Comparación del tipo de crecimiento micelial de *Fusarium* en medio mínimo mas nitrato como única fuente de nitrógeno. A la izquierda se muestra un crecimiento denso del tipo silvestre. A la derecha se muestra un crecimiento no denso característico de mutantes nit.



Figura 3. En algunos mutantes se generaban espontáneamente sectores de micelio algodonoso en medio mínimo con nitrato como única fuente de nitrógeno. Estos mutantes se descartaron debido a su inestabilidad.

Discusión

La compatibilidad vegetativa o heterocarion se ha reportado en diversos hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* (McAlpin *et al.*, 2002), *Colletotrichum coccodes* (Nitzan *et al.*, 2002); *Verticillium dahliae* (Collado-Romero *et al.*, 2006), *F. oxysporum* (Correl *et al.*, 1987), y *F. graminearum* (Chen *et al.*, 2007). Se ha demostrado que es una herramienta útil para estudiar la dinámica de poblaciones especialmente en hongos como *Fusarium* que presentan poblaciones asexuales (Leslie & Summerell, 2006). Las especies de *Fusarium* que se han encontrado causando malformación en mango en el ámbito mundial no presentan o no se ha encontrado su fase sexual (Marasas *et al.*, 2006).

En este estudio se determinó la capacidad de generación de mutantes de aislamientos de *Fusarium* sp. causantes de la

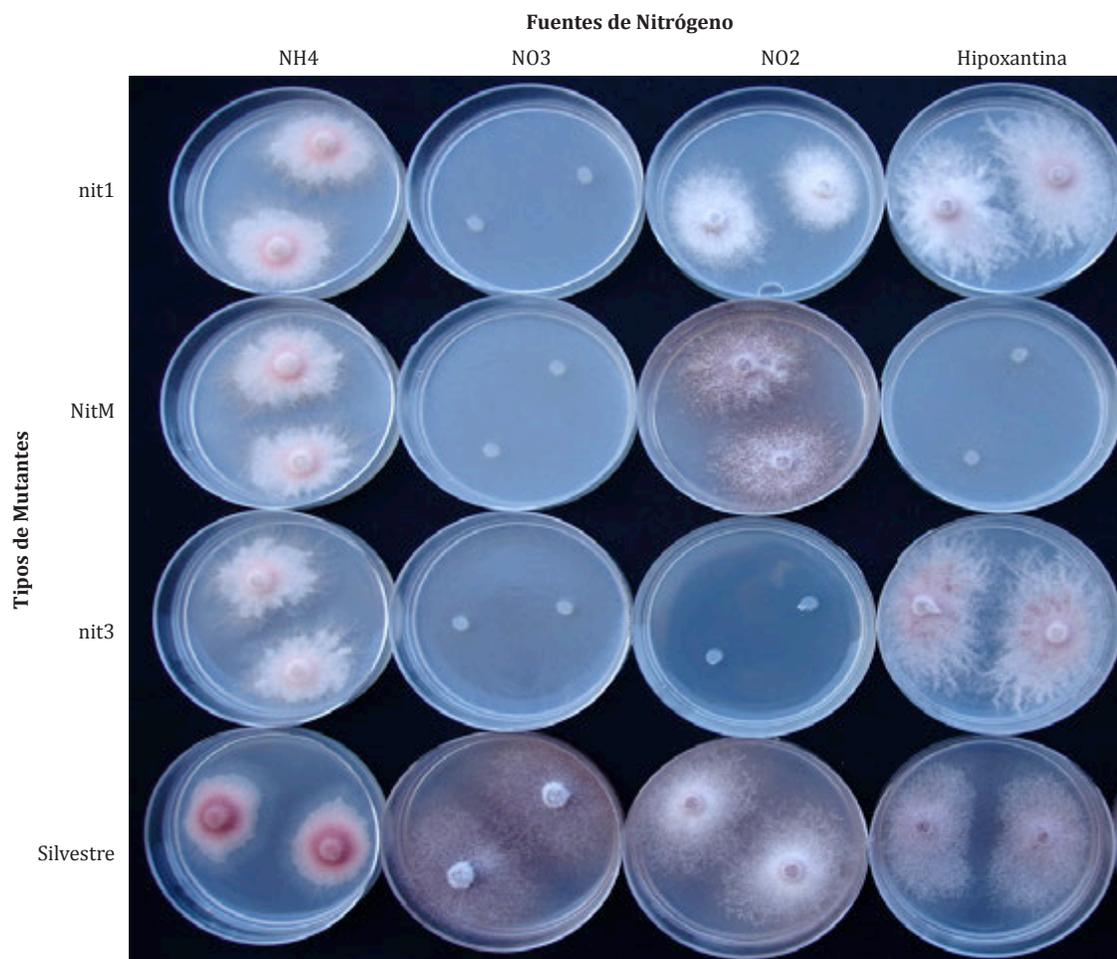


Figura 4. Tipos de mutantes crecidos en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno.

malformación del mango en Michoacán. El rango de frecuencia de generación de sectores entre los aislamientos fue amplio (Cuadro 2). En *F. oxysporum* y especies del complejo *Gibberella fujikuroi* se ha reportado que ocurre variación entre diversos aislamientos en la frecuencia y rapidez en la formación de sectores resistentes al clorato (Puhalla, 1985, Leslie & Summerell, 2006). Se utilizó una concentración de clorato del 2%. La concentración de clorato utilizada puede variar de 1.5 a 3% (Leslie & Summerell, 2006). Sin embargo, si la concentración de clorato utilizada es muy alta, algunos aislamientos sensibles al $KClO_3$ podrían no formar sectores, por lo que se recomienda empezar con concentraciones relativamente bajas. A concentraciones mayores a 4%, el clorato podría precipitar si el medio se deshidrata (Leslie & Summerell, 2006).

El 65.5% de los sectores transferidos produjeron mutantes *nit* estables. Los mutantes *nit* generados de cada aislamiento son auxotrófos, pueden crecer indefinidamente en medio mínimo con nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. La tasa de expansión radial que presentan es comparable a la de los tipos silvestres, pero su crecimiento es no denso. Esta característica se mantiene aun después de sucesivas transferencias en dicho medio (Puhalla, 1985).

En los casos de sectores que inicialmente mostraron micelio no denso pero posteriormente produjeron áreas de micelio denso

Cuadro 2. Frecuencia de generación de sectores y mutantes de *Fusarium* asociado con malformación de mango en Michoacán.

Aislamiento	No de discos	No. de sectores	Generación de sectores (%)	Frecuencia de mutantes (%)
MexMi-1	18	12	66.6	66.76
MexMi-3	18	14	77.7	57.14
MexMi-4	18	14	77.7	21.43
MexMi-5	18	14	77.7	100
MexMi-8	15	13	86.6	79.92
MexMi-10	15	6	40	83.33
MexMi-11	15	10	66.6	80
MexMi-13	15	10	66.6	40
MexMi-14	15	9	60	70
MexMi-15	18	17	94.4	64.71
MexMi-17	15	12	80	58.33
MexMi-18	15	13	86.6	75
MexMi-19	15	14	93.3	71.43
MexMi-20	18	10	55.5	60
Σ	228	168		
Rango			40 - 94.4	21.43 - 100
Promedio			73.52	66.28

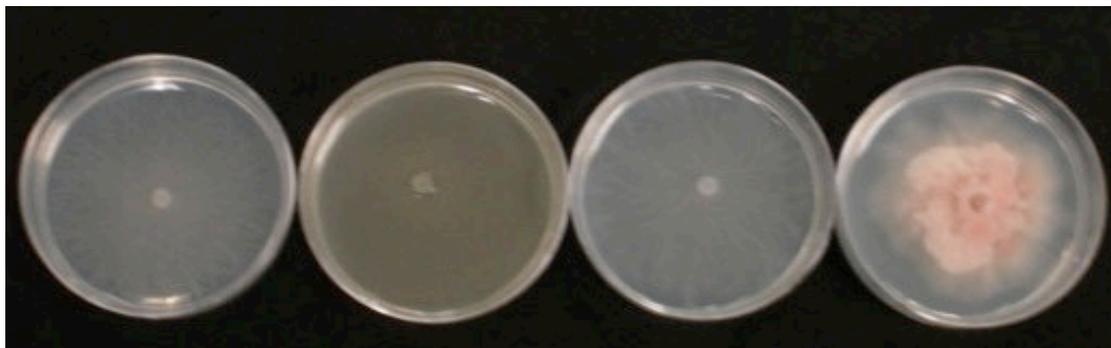


Figura 5. Los mutantes tipo nnu presentaron un crecimiento micelial no denso en medio mínimo con las fuentes de nitrógeno nitrato, nitrito o Hipoxantina.

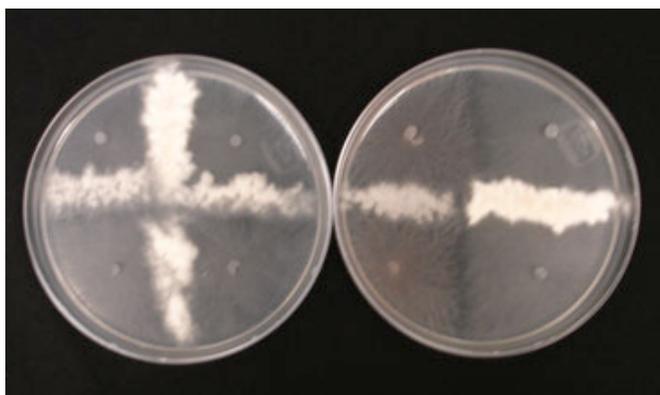


Figura 6. Compatibilidad vegetativa en mutantes de *Fusarium* sp. en medio mínimo mas nitrato como única fuente de nitrógeno. A) formación del heterocarion prototrófico (Heterocarion Self-Compatible). B) No hay formación del heterocarion prototrófico (Heterocarion Self-Incompatible)

se les conoce como revertantes. Lo anterior puede ser explicado por diversas causas: a) existen mutantes que experimentan un nuevo cambio o modificación del gen afectado; b) los mutantes que posean más de una mutación en el gen *nit* podrían ser capaces de formar heterocariones en su mismo micelio; c) existe otro tipo de mutante denominado *crn* el cual puede utilizar NaNO_3 y ser resistente al clorato. En todos estos casos, se recomienda descartar estos mutantes (Leslie & Summerell, 2006).

Algunos mutantes producidos por el aislamientos Mexmi-3, presentaron crecimiento no denso en medios con NO_3 , NO_2 e hipoxantina. En *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, los genes *nit-2* y *areA* respectivamente, codifican para factores de transcripción perteneciente a la familia GATA, que participan en la regulación de la vía global de nitrógeno (Feng y Marzluf, 1998). Los fenotipos por mutaciones en dichos locus de estas especies poseen un crecimiento no denso en los tres medios mencionados (Klittich y Leslie, 1988; Marzluf, 1997) similar a los mutantes generados en el aislamiento Mexmi-3. En *Fusarium* spp. se han reportado diversos nombres para estos locus homólogos para este factor de transcripción. Por ejemplo para *F. fujikuroi* es denominado AreA (Leslie y Summerell, 2006) mientras que para *Fusarium oxysporum* es llamado Frn1 (Divon et al., 2006). Para miembros del género *Fusarium*, como prioridad es recomendado utilizar el nombre del locus *nnu* (Leslie y Summerell, 2006).

Los fenotipos encontrados en mutantes del aislamiento MEXMI-3 podrían deberse a mutaciones en diferentes loci involucrados en el metabolismo del nitrato. Así, mutaciones en el gen regulatorio de la vía específica de nitrógeno ocasionan un fenotipo *nit3* cuyo crecimiento es no denso tanto en medios con NO_3 y NO_2 . Mientras que mutaciones en el cofactor de molibdeno, el fenotipo NitM resulta en un crecimiento no denso en medios con hipoxantina o nitrato (Leslie y Summerell, 2006). La combinación de estas dos mutaciones podría resultar en el fenotipo descrito en este análisis para los mutantes del aislamiento MEXMI-3. Debido a que las mutantes tipos *nit3* y NitM podrían no distinguirse del mutante tipo *nit1*, que cabe la posibilidad de tener los 3 loci mutados.

La diversidad genética entre poblaciones de diversas especies de *Fusarium* ha sido estudiada analizando los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) al que pertenecen los aislamientos. Se comprobó la capacidad de los aislamientos de anastomosarse entre sí y con otros aislamientos encontrando solo dos grupos de compatibilidad, indicando que existe poca variación

Cuadro 3. Fenotipos *nit* generados en medio mínimo + clorato al 2% de aislamientos de *Fusarium* asociado con malformación de mango en Michoacán

Fenotipos Nit					
Aislamiento	Nit1	Nit3	NitM	Nitnnu	Total
MexMi-1	3	3	2	0	8
MexMi-3	0	3	2	3	8
MexMi-4	3	0	0	0	3
MexMi-5	8	3	3	0	14
MexMi-8	7	3	0	0	10
MexMi-10	2	2	1	0	5
MexMi-11	2	2	4	0	8
MexMi-13	2	1	1	0	4
MexMi-14	6	0	1	0	7
MexMi-15	8	1	2	0	11
MexMi-17	4	1	2	0	7
MexMi-18	7	1	1	0	9
MexMi-19	7	2	1	0	10
MexMi-20	2	2	2	0	6
Total	61 (55.4%)	24 (21.8%)	22 (20%)	3 (2.7%)	110

Cuadro 4. Matriz de complementación en medio MM + Clorato al 2% entre mutantes de aislamientos de *Fusarium sp.* obtenidos de mango con malformación en Michoacán.

NitM	nitI												
	MexMi-1	MexMi-3	MexMi-4	MexMi-8	MexMi-10	MexMi-11	MexMi-13	MexMi-14	MexMi-15	MexMi-17	MexMi-18	MexMi-19	MexMi-20
MexMi-1	C*	C	C	I	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-3	C	C	C	I	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-4	C	C	C	I	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-8	I**	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I
MexMi-10	I	I	I	I	C	C	C	I	I	I	I	I	C
MexMi-11	I	I	I	I	C	C	C	I	I	I	I	I	C
MexMi-13	I	I	I	I	C	C	C	I	I	I	I	I	C
MexMi-14	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-15	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-17	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-18	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-19	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	C	C	I
MexMi-20	I	I	I	I	C	C	C	I	I	I	I	I	C

*C=Compatible

**I=Incompatible

genética entre los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango en Michoacán. En esta investigación se obtuvieron por primera vez mutantes *nit* de aislamientos de *Fusarium* causantes de la malformación del mango en Michoacán. Se demostró la aparición espontánea de dichos mutantes en medio con clorato. Debido a que este taxón de *Fusarium* parece estar distribuido ampliamente en huertas de mango con malformación en Michoacán y en estados vecinos (Quezada-Gutiérrez, 2008), es importante determinar si son poblaciones clonales o si está ocurriendo la reproducción sexual.

Referencias

- Chen, Y.,** Ch. Chen, J. Wang, L. Jin y M. Zhou (2007). Genetic study on JS399-19 resistance in hyphal fusion of *Fusarium graminearum* by using nitrate nonutilizing mutants as genetic markers. *Journal of Genetics and Genomics* 34: 469-476.
- Collado-Romero, M.,** J. Mercado-Blanco, C. Olivares-García, A. Valverde-Corredor y R.M. Jiménez-Díaz (2006). Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Plant Disease* 96: 485-495.
- Correll, J.C.,** C.J.R. Klittich y J.F. Leslie (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.
- Crawford N.M.** y H.N. Arst Jr. (1993). *The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. Annual Review of Genetics* 27: 115-46.
- Divon, H.H.,** C. Ziv, O. Davydov, O. Yarden, y R. Fluh (2006). The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 7: 485-497.
- Feng, B.** y G.A. Marzluf (1998). Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 a pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of genes. *Molecular and Cellular Biology* 18: 3983-3990.
- Guzmán E.C.** (2004). Malformación o "Escoba de bruja" o "Flor macho del mango" conocimiento, identificación, prevención y disminución. INIFAP – CIRNO. Campo Experimental Sur de Sinaloa. Folleto Técnico No. 5. Sinaloa, México. 41 p.
- Klittich, C.J.R.** y J.F. Leslie (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118: 417-423.
- Leslie, J.F.** y B.A. Summerell (2006). *The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing.* 388 p.
- Lima, C.S.,** J.H.A. Monteiro, N.C. Crespo, S.S. Costa, J.F. Leslie y L.H. Pfening (2009). VCG and AFLP analyses identify the same groups in the causal agents of mango malformation in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 123: 17-26
- Marasas, W.F.O.,** R.C. Ploetz, M.J. Wingfield, B.D. Wingfield y E.T. Steenkamp (2006). Mango malformation disease and associated *Fusarium* species. *Plant Disease* 96:667-672.
- Marzluf, G.A.** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- McAlpin C.E.,** D.T. Wicklow y B.W. Horn (2002). DNA fingerprinting analysis of vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus* from a peanut field in Georgia. *Plant Disease* 86: 254-258.
- Nitzan, N.,** M. Hazanovsky, M. Tal y L. Tsvor (2002). Vegetative

- compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. *Phytopathology* 92: 827- 832.
- Rodríguez-Alvarado, G.**, S.P. Fernández-Pavía, R.C. Ploetz y M. Valenzuela-Vázquez (2008). A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico. *Plant Pathology* 57:781.
- Prieto, M.J.J.**, Covarrubias, A.J.E., Romero, C.A. y V.M.O. Figueroa (2005). Paquetes tecnológicos para el cultivo de mango en el estado de Colima. [En línea] <http://www.CampoColima.gov.mx/.../PlanRectorMango.pdf>. [Consultada: 15 de Octubre del 2009].
- Puhalla J.** (1985). Classification of strains of *Fusarium* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.
- Salazar-García, S.** (1995). Mango Malformation: A Review. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13:64-75.
- Quezada-Gutiérrez, M. C.** (2008). Caracterización morfológica de aislamientos de *Fusarium* sp. Obtenidos de árboles de mango con malformación en el estado de Colima. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 55 p.
- Steenkamp, E.T.**, H. Britz, T.A. Coutinho, B.D. Winfield, W.F.O. Marasas y M.J. Winfield (2000). Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Molecular Plant Pathology* 1: 187-193.
- Swift, C.E.**, E.R. Wickliffe y H.F. Schwartz (2002). Vegetative Compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Disease* 86: 606-610.
- Valente-Morales, J.N.** (2006). Caracterización de aislamientos de *Fusarium* sp. obtenidos de árboles de mango con "escoba de bruja". Tesis de Licenciatura. Fac. de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 55 p.
- Zheng Q.** y R.C. Ploetz (2002). Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR essay. *Plant Pathology* 51: 208-216.