

# First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico

## Primer reporte de *Cladosporium cladosporioides* causando pudriciones en frutos de zapote mante en México

**Olivia Nabor-Romero, Manuel Silva-Valenzuela, Reyna Isabel Rojas-Martínez\***, Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Interacción Planta-Patógeno-Vector. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, México, C.P. 56230, México; **Ramón Garza-García**, Campo Experimental Valle de México. Carretera Texcoco-los Reyes-km. 13.5 Texcoco, Coatlinchan, C.P. 56250, Texcoco, México. \*Autor para correspondencia: rojas@colpos.mx.

Recibido: 04 de Diciembre, 2017.

Aceptado: 23 de Marzo, 2018.

Nabor-Romero O, Silva-Valenzuela M, Rojas-Martínez RI, Garza-García R. 2018. First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 356-362.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1712-1

Primera publicación DOI: 17 de Abril, 2018.

First DOI publication: April 17, 2018.

**Resumen.** El consumo del zapote mante (*Pouteria campechiana*) en México se ha incrementado, siendo el municipio de El Mante, Tamaulipas, uno de los principales productores. En un huerto no comercial se observaron en frutos manchas hundidas de color marrón que coalescen. El objetivo de este estudio fue identificar el agente causal de la mancha del fruto de zapote mante. Con los hongos aislados se realizaron los postulados de Koch, se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr mediante PCR utilizando los iniciadores universales ITS1-ITS4. El análisis morfológico y molecular indicó que

**Abstract.** The consumption of zapote mante (*Pouteria campechiana*) in Mexico has increased, being the municipality of El Mante, Tamaulipas, one of the main producers. In a non-commercial garden, sunken spots of brown color coalesced in fruits. The objective of this study was to identify the causal agent of the spot of fruit de zapote mante. With the fungi isolated, the Koch postulates were amplified, and the ITS region of the rDNA was amplified by PCR using the universal primers ITS1-ITS4. Morphological and molecular analysis indicated that the causal agent of the fruit blotch is the fungus *Cladosporium cladosporioides*. To our knowledge, this is the first report of this pathogen affecting this zapote mante in Mexico.

**Key words:** sunken spots, fungi, Koch postulate, PCR.

The genus *Pouteria* includes species for fruit production potential, among which is the zapote mante, also called yellow or canistel zapote (*P.*

*Cladosporium cladosporioides* es el agente causal de la mancha del fruto. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de este patógeno afectando a zapote mante en México.

**Palabras clave:** mancha hundida, hongo, postulados de Koch, PCR.

En el género *Pouteria* se encuentran especies con alto potencial frutícola, entre las cuales se incluye al zapote mante, amarillo o canistel (*P. campechiana*). Su origen es el sur de México y Centro América. En México, su producción y comercialización va en aumento, su consumo es regional como alimento fresco o bien para fabricar alimentos procesados, obtener aceites para industria de cosméticos y como medicina. Esta zapotacea se produce en el municipio de El Mante, Tamaulipas; en donde se observaron frutos con manchas hundidas que provocan pudrición. No se sabe a partir de cuándo se presentó la enfermedad, ni el patógeno que la induce. El objetivo de esta investigación fue identificar al agente causal, mediante pruebas de patogenicidad, características morfológicas y pruebas moleculares.

En un huerto no comercial, en Ciudad Mante, municipio de El Mante, Tamaulipas, México, se colectaron 30 frutos de zapote mante; los cuales, presentaron manchas hundidas de color marrón a negro (1-3 cm de diámetro) en gran parte del epicarpio y que al tiempo coleasen. Los frutos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Enseguida, se colocaron en cámara húmeda a 27 °C y cuando se observó la esporulación, las estructuras fungosas se colocaron sobre una placa de papa dextrosa agar (PDA 39 g L<sup>-1</sup> de agua). Este procedimiento se realizó para cada fruto colectado, obteniéndose un total de 180 aislamientos, los cuales se mantuvieron en placas de PDA a 27 °C en oscuridad total.

*campechiana*). This species is native to southern Mexico and Central America. In Mexico, its production and marketing are increasing, as well as its regional consumption as fresh food or to manufacture processed foods, oils for the cosmetics industry, or as medication. This sapotacea is produced in the municipality of El Mante, Tamaulipas, Mexico, where fruits with sunken spots that cause rot have been observed. No one knows when the disease appeared nor the pathogen that causes it. The objective of this research was to identify the causal agent by performing pathogenicity, morphological and molecular tests.

In a non-commercial orchard in Ciudad Mante, municipality of El Mante, Tamaulipas, Mexico, 30 zapote mante fruits were collected that showed brown to black sunken spots (1-3 cm in diameter) on most of the epicarp which, in time, coalesced. The fruits were disinfected with a 1% sodium hypochlorite solution for 3 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then they were placed in a humid chamber at 27 °C, and when sporulation began, the fungal structures were placed on a petri dish containing potato-dextrose-agar (PDA 39 g L<sup>-1</sup> of water). This procedure was used for each collected fruit and a total of 180 isolates were obtained and kept on petri dishes with PDA at 27 °C in total darkness.

The morphology of the isolates was described with temporary and permanent preparations. The fungal structures were observed under a microscope and measured at least 50 times each. Later, the keys of Barnett and Hunter (1998) and Bensch *et al.*, (2012) were used to determine the genus. Based on the keys, the obtained isolates were termed MTCc (144 isolates), MTCO (22 isolates) and MT1 (14 isolates).

In the pathogenicity tests, only the MTCc and MTCO isolates (treatments) were used, and in each case, the morphotype was used most frequently. Forty symptomless ripe zapote mante fruits were

La descripción morfológica de los aislamientos se realizó con preparaciones temporales, y permanentes, se observaron bajo microscopio las estructuras fungosas y se midieron al menos 50 veces cada una de ellas, posteriormente para la determinación del género se siguieron las claves de Barnett y Hunter (1998) y Bensch *et al.* (2012). Con base en estas claves los aislamientos obtenidos se denominaron MTCc (144 aislamientos), MTCO (22 aislamientos) y MT1 (14 aislamientos).

En las pruebas de patogenicidad solo se utilizaron los aislamientos MTCc y MTCO (tratamientos) y en cada caso se utilizó el morfotipo con mayor frecuencia. Se inocularon 40 frutos maduros de zapote mante, asintomáticos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se evaluaron dos niveles de inóculo,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^4$  conidios por mL para inocular dos grupos de 20 frutos. La suspensión de conidios se obtuvo a partir de cultivos monospóricos de los aislamientos MTCc y MTCO, respectivamente. En los frutos de cada tratamiento se produjeron pequeñas heridas con una aguja estéril, a las que se les asperjaron tres mL de la suspensión de conidios; de igual manera a los 20 frutos testigo se les produjeron pequeñas heridas con una aguja estéril y se les asperjó agua destilada estéril. Los 60 frutos de cada tratamiento se colocaron en una cámara húmeda a 27 °C durante 12 días, tiempo en el cual se registró el desarrollo de síntomas en los frutos; cuando estos fueron evidentes, se realizaron aislamientos de micelio crecido en el síntoma. Este experimento se repitió una vez más. Cabe señalar que en ambos ensayos el aislamiento denominado MTCO y el tratamiento testigo no indujeron ningún síntoma en los frutos inoculados. En contraste, el aislamiento MTCc con cada nivel de inóculo indujo síntomas muy similares a los observados en campo. Los reaislamientos obtenidos se denominaron MTCc-pp, se mantuvieron en placas de PDA a 27 °C en oscuridad total.

disinfected with 1% sodium hypochlorite and rinsed with sterile distilled water. Two levels of inoculum ( $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^4$  conidia per mL) were evaluated and used to inoculate two groups of 20 fruits. A conidial suspension was obtained from monosporic cultures of the MTCc and MTCO isolates. In the fruits of each treatment small cuts were made using a sterile needle, and then sprayed with 3 mL of the conidial suspension. Small cuts with a sterile needle were also made on the 20 control fruits, and sprayed with sterile distilled water. All 60 fruits in each treatment were placed in a moisture chamber at 27 °C for 12 days, during which the fruit developed symptoms; when the symptoms became evident, isolates of the mycelium growing on the symptoms were made. This experiment was repeated one more time. It should be noted that in both assays, neither the isolate called MTCO nor the control treatment induced symptoms in the inoculated fruits. In contrast, the MTCc isolate at each level of inoculum induced symptoms very similar to those observed in the field. The re-isolates obtained were named MTCc-pp and kept on petri dishes containing PDA at 27 °C in total darkness.

For the molecular characterization of the MTCc isolate and of the isolates obtained from the pathogenicity test (MTCc-pp), total genomic DNA was extracted. We used 200 mg of mycelium grown for five days in PD (potato dextrose) liquid medium and kept in a thermo-shaker at 112 rpm. The 200 mg of mycelium were incubated for 1 h at 60 °C in 1,000  $\mu$ L of extraction buffer (NaCl 0,7 M, Tris 0,1 M pH 7,5, 0,01 M EDTA pH 8,0, 1%  $\beta$ -ME and 1% CTAB) and moderately shaken every 5-10 min. Subsequently, 200  $\mu$ L of NaAc 3 M were added, and placed at -20 °C for 20 min, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. For DNA precipitation, 750  $\mu$ L of the supernatant were taken and placed in a new 1.5 mL tube; then, 750  $\mu$ L of cold isopropanol were added

Para la caracterización molecular del aislamiento MTCc y de los aislamientos obtenidos de la prueba de patogenicidad (MTCc-pp); se extrajo el ADN genómico total. Se utilizaron 200 mg de micelio crecido durante cinco días en medio líquido PD (papa dextrosa) mantenido en un termo agitador a 112 rpm. Los 200 mg de micelio se incubaron por 1 h a 60 °C en 1,000 µL de buffer de extracción (NaCl 0,7 M, Tris 0,1 M pH 7,5, 0,01 M EDTA pH 8,0, 1% β-ME, y 1% CTAB) agitando moderadamente cada 5-10 min. Posteriormente se le adicionó 200 µL de NaAc 3 M, y se colocó a -20 °C durante 20 min, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm por 10 min. Para la precipitación del ADN se tomaron 750 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 1,5 mL, enseguida se añadieron 750 µL de isopropanol frío y se mantuvo a -20 °C por 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó tres veces con 100 µL de etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µL de agua libre de ADNsas. Finalmente, el ADN se almacenó a -20 °C.

En la reacción en cadena de la polimerasa se usaron los iniciadores universales ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3'). La mezcla para PCR con un volumen final de 25 µL, consistió en agua libre de ADNsas, buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP's 2 mM, 1U de Taq ADN polimerasa (Promega®), iniciadores 1 pmol y 100 ng/µL de ADN, con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo a 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 30s, 55 °C por 30s y 72 °C por un min. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1% + bromuro de etidio, en un fotodocumentador Gel-Doc 2,000. Posteriormente, el producto de PCR de los aislamientos MTCc y MTCc-pp se purificaron con el kit Wizard® SV gel

and kept at -20 °C for 20 min. After this period, they were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm, the supernatant was discarded, the pellet was washed three times with 100 µL of cold 70% ethanol, dried at room temperature and re-suspended in 30 µL of water free of DNase. Finally, the DNA was stored at -20 °C.

For the polymerase chain reaction, the universal primers ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3') were used. The mixture for the PCR with a final volume of 25 µL consisted of DNase-free water, 1X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTP's 2 mM, 1U of Taq DNA polymerase (Promega®), 1 pmol primers and 100 ng/µL of DNA, with the following amplification conditions: one cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for one min. The amplification products were visualized in 1% agarose gel + ethidium bromide in a Gel-Doc 2,000 photo-documentation system. Later, the products of the MTCc and MTCc-pp isolates obtained through PCR were purified using the Wizard® SV gel kit and PCR Clean-up System (Promega) and sequenced using an automatic 16-capillary DNA sequencer (Applied Biosystems, model 3130xl).

The obtained sequences were assembled using the Mega 7 program, where they were cleansed to correct possible sequencing errors; then they were aligned to obtain a consensus sequence of 572 base pairs, which was compared to the sequences reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Blast tool. Then a phylogenetic analysis was performed following the Neighbor-Joining method with 5,000 bootstrap replications.

From the obtained isolates, two fungi were identified: *Colletotrichum* sp. (MTCO) and *Cladosporium* sp. (MTCc); a third one produced

and PCR Clean-up System (Promega) y se secuenciaron en un secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron en el programa Mega 7, en donde se realizó una limpieza para corregir los posibles errores de secuenciación, posteriormente se alinearon para obtener una secuencia consenso de 572 pares de bases, la cual se comparó con secuencias reportadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante la herramienta Blast. Enseguida, se hizo un análisis filogenético usando el método Neighbor-Joining con 5,000 réplicas de bootstrap.

De los aislamientos obtenidos, se identificaron dos hongos: *Colletotrichum* sp. (MTCO) y *Cladosporium* sp. (MTCc) y un tercero que produjo un estroma esclerosado (MT1), el cual no fue identificado. *Cladosporium* sp. fue el que se presentó con mayor frecuencia con un 8.5% de asociación con las lesiones de la enfermedad. Los aislamientos de *Cladosporium* sp., presentaron características culturales similares, consistentes con las reportadas para este género (Bensch *et al.*, 2012). En el microscopio compuesto se observó la presencia de conidióforos cilíndricos macronematosos nodulosos alejados entre sí, con una sola célula conidiogénica, los conidios presentan uno o ningún septo y midieron de ancho 3 a 5  $\mu\text{m}$ , siendo estas características las reportadas para *C. cladosporioides* (Bensch *et al.*, 2012).

En las pruebas de patogenicidad, con los dos niveles de inóculo evaluados, se observaron zonas hundidas en el epicarpio 48 h después de la inoculación. A las 72 h, en las zonas hundidas se observaron manchas de color marrón que posteriormente se necrosaron y coalescieron en el fruto. Sobre las manchas, se desarrolló micelio de color blanco que presentaba estructuras morfológicas muy similares a las del aislamiento MTCc. Los reaislamientos

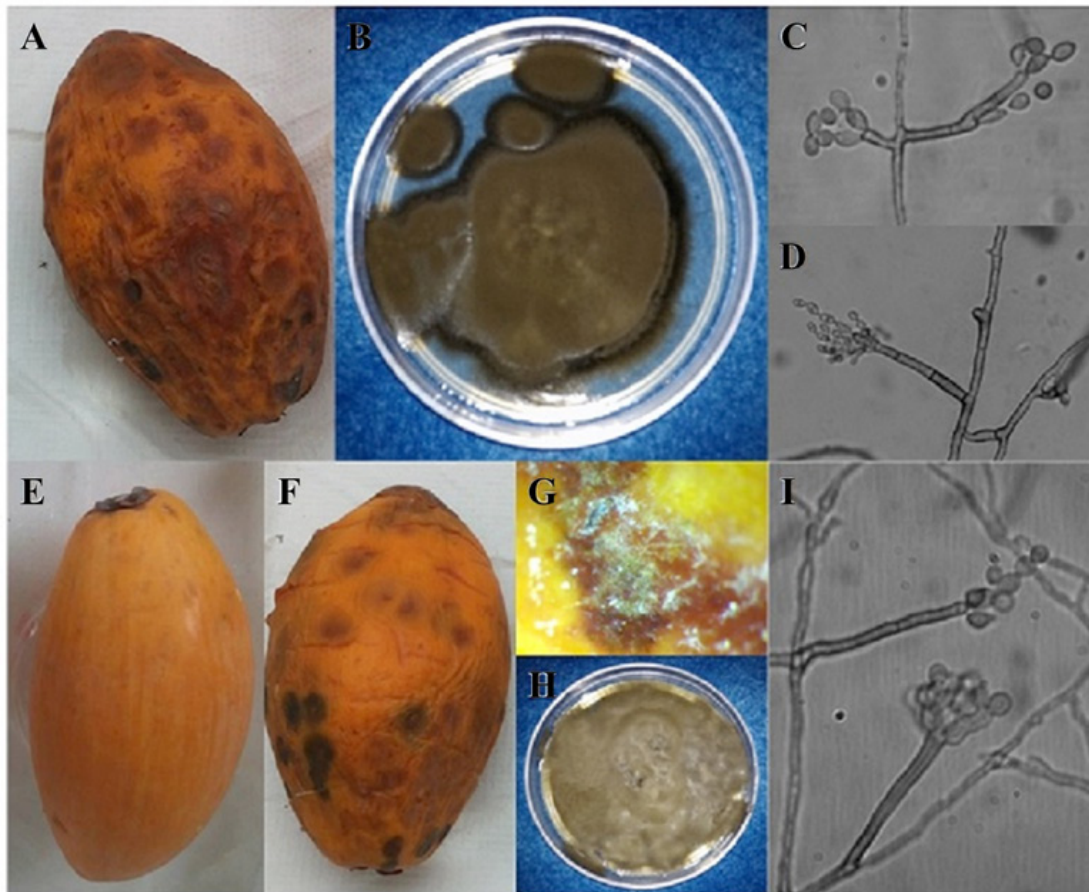
a sclerosed stroma (MT1), but was not identified. *Cladosporium* sp. was the most frequently present fungus and showed an 80.5% association with the disease lesions. The *Cladosporium* sp. isolates showed similar culture traits consistent with those reported for this genus (Bensch *et al.*, 2012). The presence of nodulous macronematous cylindrical conidiophores far from each other, with a single conidiogenic cell was observed under a compound microscope; conidia had one or no septum and were 3 to 5  $\mu\text{m}$  wide, which are characteristics reported for *C. cladosporioides* (Bensch *et al.*, 2012).

In the pathogenicity tests using the two evaluated inoculum levels, sunken areas were observed in the epicarp 48 h after inoculation. At 72 h, brown spots were observed on the sunken areas which later became necrotic and coalesced on the fruit. White mycelium grew on the spots and had morphological structures very similar to those of the MTCc isolate. The re-isolates obtained coincided with the culture and morphological traits of the isolate, which proved that this isolate produced the sunken spots in zapote mante (Figure 1).

The obtained sequences were analyzed using the NCBI BLAST tool and the results showed that they were 99% similar to the sequences reported for *Cladosporium cladosporioides*. The sequence of the MTCc isolate was deposited in the GenBank (access number KP788715). In the phylogenetic analysis, the identity of the MTCc isolate was established based on its close relationship with isolates reported as *Cladosporium cladosporioides*. The symptoms observed coincide with those described for *Cladosporium cladosporioides*, which affects tangerine (*Citrus reticulata*), papaya (*Papaya carica*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and mango (*Mangifera indica* L.) (Guillen-Sánchez *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2012; Tashiro *et al.*, 2013), and demonstrates the impact of this pathogen on different fruit crops; it also reduces

obtenidos coincidieron con las características culturales y morfológicas de dicho aislamiento, demostrándose así que esta originaba la mancha hundida en frutos de zapote mante (Figura 1).

their commercial value due to the unpleasant appearance of the epicarp. As far as we know, this is the first time in Mexico that *Cladosporium cladosporioides* has been reported to produce necrotic spots on zapote mante fruits.



**Figura 1.** Caracterización morfológica y pruebas de patogenicidad de *Cladosporium cladosporioides* en frutos de zapote mante (*Pouteria campechiana*) en Ciudad Mante, Tamaulipas, México. A) Fruto con manchas hundidas de color marrón; B) Aislamiento MTCc; C y D) Conidióforos macronematosos nodulosos y conidios elipsoidales de *Cladosporium cladosporioides*. E-I) Pruebas de patogenicidad; E) Fruto utilizado como testigo; F) Fruto inoculado con zonas hundidas de color marrón; G) Presencia de estructuras morfológicas del aislamiento MTCc en fruto inoculado; H) Reaislamiento obtenido de fruto inoculado en pruebas de patogenicidad; I) Conidióforos y conidios de *Cladosporium cladosporioides*.

**Figure 1.** Morphological characterization and pathogenicity tests were used to identify *Cladosporium cladosporioides* in zapote mante fruits (*Pouteria campechiana*) in Ciudad Mante, Tamaulipas, Mexico. A) Fruit with brown sunken spots; B) MTCc isolate; C and D) macronematous and ellipsoidal conidiophores of *Cladosporium cladosporioides*. E-I) Pathogenicity tests; E) Fruit used as a control; F) Inoculated fruit showing brown sunken areas; G) Presence of morphological structures on the MTCc isolate on inoculated fruit; H) Re-isolate obtained from inoculated fruits in pathogenicity tests; I) Conidiophores and conidia of *Cladosporium cladosporioides*.

Las secuencias obtenidas se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI, en donde se observó un 99% de similitud con secuencias reportadas de *Cladosporium cladosporioides*. La secuencia del aislamiento MTCc se depositó en el GenBank (número de acceso KP788715). En el análisis filogenético se comprobó la identidad del aislamiento MTCc al establecer una estrecha relación con aislamientos reportados como *Cladosporium cladosporioides*.

Los síntomas observados, coinciden con los descritos para *Cladosporium cladosporioides* afectando mandarina (*Citrus reticulata*), papaya (*Papaya carica*), maracuyá (*Passiflora edulis*), y mango (*Mangifera indica* L.) (Guillen-Sánchez *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2012; Tashiro *et al.*, 2013) demostrando el impacto de este patógeno en diferentes frutales, al disminuir su valor comercial debido a la apariencia desagradable del epicarpio. Hasta donde se conoce este es el primer reporte en México de *Cladosporium cladosporioides* causando manchas necróticas en frutos de zapote mante.

## CONCLUSIONES

Mediante los postulados de Koch y pruebas moleculares se comprueba que el patógeno responsable de inducir las manchas hundidas en el fruto de zapote mante *Pouteria campechiana*, es *Cladosporium cladosporioides* y representa el primer reporte de esta especie parasitando a frutos de mante.

## CONCLUSIONS

Whit Koch postulates and molecular tests, we proved that the pathogen responsible for inducing sunken spots on zapote mante (*Pouteria campechiana*) is *Cladosporium cladosporioides*; this is the first time this species has been reported to infest zapote mante fruits.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minn. 218p.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72:1-401. DOI: 10.3114/sim0003
- Guillén-Sánchez D, Yañez-Morales M.J, Téliz-Ortiz D, Siebe-Grabach C and Bautista-Baños S. 2007. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on mango tree panicles: symptoms, pathogenicity and severity of the fungus. Fruits 62:361-368. DOI: 10.1051/fruits: 2007032
- Tashiro N, Noguchi M, Ide Y and Kuchiki F. 2013. Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in Postharvest Satsuma mandarin grow in heated greenhouses. Journal of General Plant Pathology 79:158-161. DOI: 10.1007/s10327-013-0430-1
- Vásquez LA, Hernández CE, Mora A JA, Nava DC y Sánchez GF. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. Agrociencia 46:757-767. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_artext&pid=S1405-31952012000800002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_artext&pid=S1405-31952012000800002)