

Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico

Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México

Isabel Cruz-Lachica, Isidro Márquez-Zequera, Raymundo Saúl García-Estrada, José Armando Carrillo-Fasio, Josefina León-Félix, Raúl Allende-Molar*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80110. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 08 de Noviembre, 2016.

Aceptado: 03 de Julio, 2017.

Cruz-Lachica I, Márquez-Zequera I, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Allende-Molar R. 2017. Identification of mucoralean fungi causing soft rot in papaya (*Carica papaya* L.) fruit in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 397-417.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-3

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 03, 2017.

Resumen. México es uno de los principales productores de papaya a nivel mundial; sin embargo, la producción es afectada por enfermedades fúngicas, siendo la pudrición blanda de frutos una causa de pérdidas en precosecha y en poscosecha. La enfermedad es común; sin embargo, la información acerca de los agentes causales es escasa. El objetivo de este trabajo fue identificar a los hongos mucorales causantes de pudrición blanda mediante caracterización morfológica y molecular. Se recolectaron frutos enfermos durante el periodo mayo-octubre de 2014 en Colima, Veracruz y Oaxaca. Se

Abstract. México is one of the main papaya producers worldwide; however, yield is affected by fungal diseases such as the fruit soft rot, which causes preharvest and postharvest losses. Although it is a common disease, information related to the identification of the causal agents is scarce. The objective in this study was to identify by morphological and molecular techniques the species of mucoralean fungi responsables of papaya soft rot. Diseased fruits were collected during May-October 2014 in production regions in Colima, Veracruz, and Oaxaca. Mucoralean fungi were isolated, their pathogenicity was determined by the Koch's postulates and fungal structures were registered. The molecular characterization was conducted by analyzing the ITS and 28S (LSU) ribosomal regions. The identification was confirmed by comparison with sequences deposited in the Genbank and by phylogenetic analysis. The strains isolated in this study were placed in monophyletic clades supporting to *Gilbertella persicaria* detected in the three states sampled, *Mucor irregularis* in Veracruz, and *Rhizopus oryzae* in Oaxaca as the

aislaron hongos mucorales, se determinó la patogenicidad con los postulados de Koch y se registraron datos de estructuras fúngicas. La caracterización molecular se realizó mediante análisis de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 28S (LSU) ribosomal. La identificación de las especies se confirmó por comparación con secuencias del Genbank y análisis filogenético. Las cepas aisladas en este estudio se ubicaron en clados monofiléticos soportando a las especies *Gilbertella persicaria* que se encontró en los tres estados muestreados, *Mucor irregularis* en Veracruz y *Rhizopus oryzae* en Oaxaca, como los agentes causales de pudrición blanda en papaya. Este es el primer reporte de *M. irregularis* y *R. oryzae* afectando frutos de papaya en México. Aunque *G. persicaria* ya se ha reportado causando enfermedad en Colima, aquí se demuestra su distribución en Oaxaca y Veracruz.

Palabras clave: *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, *Rhizopus oryzae*, esporangios.

INTRODUCCIÓN

México produce aproximadamente 764,514 t de papaya (*Carica papaya* L.) al año (FAO, 2014). Debido a su volumen de producción y generación de recursos, es importante en mercado nacional e internacional; sin embargo, los frutos de papaya muestran susceptibilidad a distintos microorganismos entre los que destacan los hongos, los cuales ocasionan pérdidas entre 10 al 50% debido a daños en la calidad (Morton, 1987; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Dentro de los hongos mucorales reportados como fitopatógenos importantes se encuentran *Gilbertella persicaria*, *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. (Hyde *et al.*, 2014), incluidos en las familias *Choanephoraceae*, *Mucoraceae* y *Rhizopodaceae*,

causal agents of papaya soft rot. This is the first report of *M. irregularis* and *R. oryzae* affecting papaya fruit in Mexico. Although *G. persicaria* has been reported in Colima State, this study shows its presence in Oaxaca and Veracruz States.

Key words: *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, *Rhizopus oryzae*, sporangia.

INTRODUCTION

Every year, Mexico produces approximately 764,514 t of papaya (*Carica papaya* L.) (FAO, 2014). Due to its production volume and creation of income, it is important in the national and international markets; however, papaya fruits are susceptible to different microorganisms, some of the most important of which are fungi, which cause losses of 10 up to 50% due to quality losses (Morton, 1987; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Some of the mucoralean fungi reported as important plant pathogens include *Gilbertella persicaria*, *Mucor* spp., and *Rhizopus* spp. (Hyde *et al.*, 2014), included in the families *Choanephoraceae*, *Mucoraceae*, and *Rhizopodaceae*, respectively, which cause soft rot in fruits such as pears, apples, and peaches, and vegetables such as tomatoes. They spread quickly and have been widely reported in areas with tropical and subtropical climates (Michailides and Spotts, 1990).

Mucorales are mainly saprophytic fungi that live on the soil and decomposing plants. *Mucor* spp. are considered a polyphyletic group, and it is therefore necessary to carry out studies in several conserved regions of the genome for its correct identification (Hyde *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2013). *Gilbertella persicaria* is the only species in its genus (Benny, 1991; Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013) and it shows a high degree

respectivamente, los cuales ocasionan pudrición blanda de frutas como pera, manzana y durazno, y hortalizas como el tomate, son de rápida propagación y se han reportado ampliamente en zonas con climas tropicales y subtropicales (Michailides y Spotts, 1990).

Los mucorales son principalmente hongos saprofiticos que habitan suelo y en plantas en descomposición. *Mucor* spp. se consideran un grupo polifilético, por lo que es necesario realizar estudios en múltiples regiones conservadas del genoma para su correcta identificación (Hyde *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2013). *Gilbertella persicaria* es la única especie de su género (Benny, 1991; Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013) y muestra un elevado grado de polimorfismo a nivel de morfología colonial y tasa de desarrollo micelial (Papp *et al.*, 2001). Dentro de *Rhizopus*, destacan las especies *R. oryzae* (syn. *R. arrhizus*) y *R. stolonifer* debido al gran número de casos reportados (Hyde *et al.*, 2014).

En México, los hongos mucorales ocasionan pudrición blanda de frutos de papaya en precosecha y poscosecha por lo que afectan el rendimiento y la calidad de los frutos en porcentajes aun no estimados. Recientemente, *G. persicaria* se reportó afectando frutos en el estado de Colima (Cruz-Lachica *et al.*, 2016); sin embargo, los estudios de identificación de estas especies son escasos y están basados en características morfológicas del microorganismo y en síntomas de la enfermedad (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013), lo cual en estas especies es altamente susceptible a errores (Ginting *et al.*, 1996). El objetivo de este estudio fue identificar las especies de hongos mucorales causantes de pudrición blanda en frutos de papaya mediante una identificación que incluyó caracterización morfológica y molecular.

of polymorphism in terms of colonial morphology and mycelial development rate (Papp *et al.*, 2001). Within *Rhizopus*, the species that stand out are *R. oryzae* (syn. *R. arrhizus*) and *R. stolonifer* due to the large number of cases reported (Hyde *et al.*, 2014).

In Mexico, mucoralean fungi cause soft rot in papaya fruits in preharvest and postharvest, and therefore affect fruit yield and quality in yet uncalculated percentages. Recently, *G. persicaria* was reported to be affecting fruits in the state of Colima (Cruz-Lachica *et al.*, 2016); however, the identification studies of these species are scarce and are based on the morphological characteristics of the microorganisms and in symptoms of the disease (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013), which, in these species, is highly susceptible to errors (Ginting *et al.*, 1996). The aim of this study was to identify the species of mucoralean fungi that cause soft rot in papaya fruits by an identification process that included morphological and molecular characterization.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

The collection of fruits with symptoms of soft rot (Figure 1A) was carried out based on its incidence on cv. Maradol papaya orchards during different sample collections in 2014: two in Tecmán, Colima in May and August in the orchard El Trébol (18° 53' 04.9" N, 103° 56' 33.7" O), one in October in Oaxaca in the town of San José Río Verde Jamiltepec (16° 08' 12" N, 97° 45' 11" O), and two more carried out in October in Veracruz, in the El Diamante orchard in Cotaxtla (18° 52' 25" N, 96° 12' 2" O) and in Tlalixcoyan (21° 50' 3" N, 96° 10' 35" O).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

La recolección de frutos con síntomas de pudrición blanda (Figura 1A) se realizó con base en su incidencia en huertos de papaya *cv.* Maradol, durante diferentes muestreos en 2014: dos en Tecmán, Colima durante mayo y agosto, en el huerto El Trébol (18° 53' 04.9" N, 103° 56' 33.7" O); uno realizado en octubre en Oaxaca en la localidad de San José Río Verde Jamiltepec (16° 08' 12" N, 97°

Isolation, purification, and conservation of mucoralean fungi

For each fruit with symptoms, the area with lesions was divided into quadrants and a section was taken from the edge, (approximately 0.5 cm of tissue from each section) and were washed with ethyl alcohol at 70% for 1 min, followed by a later wash with distilled water. They were then placed in plates with PDA (Potato Dextrose Agar, Bioxon) and incubated at 27 °C. They were purified by transferring hyphal tips onto new PDA

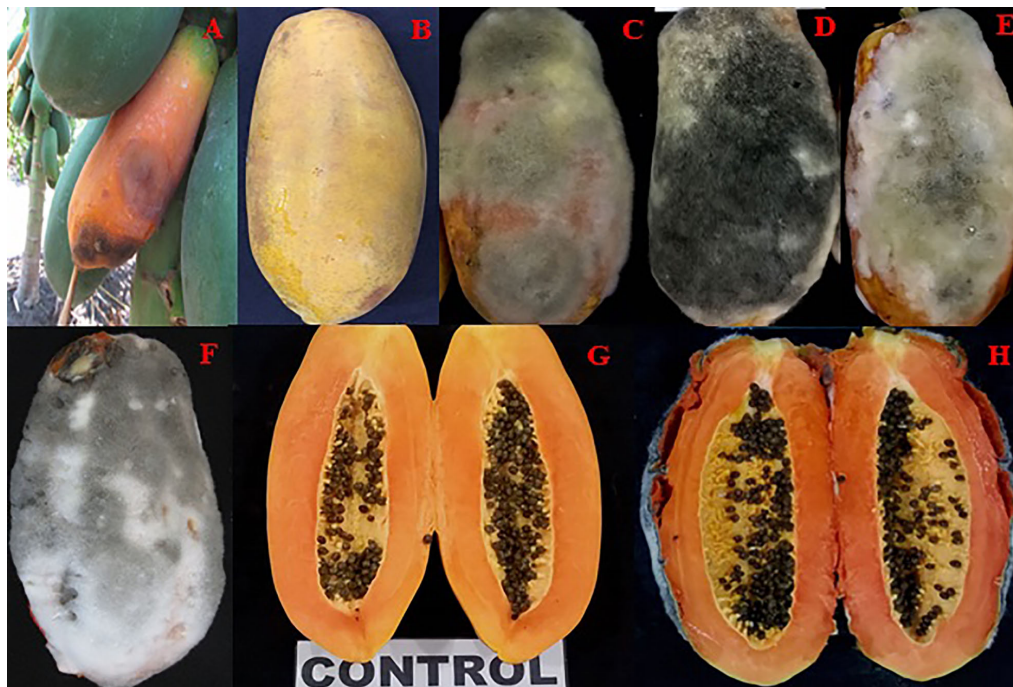


Figura 1. Patogenicidad de cepas de mucorales en frutos de papaya Maradol. (A) Fruto con signos y síntomas en campo (B y G) Fruto control asperjado con agua destilada estéril sin síntomas, (C) Fruto con esporangios color café oscuro de *Gilbertella persicaria* morfotipo 1, (D) Fruto con esporangios de color gris a negro de *Gilbertella persicaria* morfotipo 2, (E) Fruto con esporangios café claro de *Mucor irregularis*, (F) Fruto con esporangios gris a negro de *Rhizopus oryzae* y, (H) Corte longitudinal de un fruto con visible pudrición blanda interna y desprendimiento de tejidos por acción enzimática.

Figure 1. Pathogenicity of mucoralean strains in Maradol papaya fruits. (A) Fruit with signs and symptoms in field, (B and G) Control fruit sprayed with distilled water without symptoms, (C) Fruit with dark-brown colored morphotype 1 *Gilbertella persicaria* sporangia, (D) Fruit with gray to black-colored morphotype 2 *Gilbertella persicaria* sporangia, (E) Fruit with light brown-colored *Mucor irregularis* sporangia, (F) Fruit with gray to brown colored *Rhizopus oryzae* sporangia, and (H) Cross section of a fruit with visible internal soft rot and detachment of tissues due to enzymatic action.

45° 11' O), y dos más realizados durante octubre en Veracruz, en el huerto El Diamante en Cotaxtla (18° 52' 25" N, 96° 12' 2" O) y en Tlalixcoyan (21° 50' 3" N, 96° 10' 35" O).

Aislamiento, purificación y preservación de hongos mucorales

De cada fruto con síntomas, se dividió el área de las lesiones en cuadrantes y se tomó un trozo del borde de aproximadamente 0.5 cm de tejido por sección y se lavaron con alcohol etílico al 70% durante 1 min, con un lavado posterior con agua destilada; después, se sembraron en placas con PDA (Agar Papa Dextrosa, Bioxon) y se incubaron a 27 °C. La purificación se realizó por transferencia de puntas de hifas a nuevas placas de PDA y posteriormente se obtuvieron cultivos monospóricos (Chukwuka *et al.*, 2010; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). Los aislados se preservaron en tubos de vidrio con agua destilada estéril, para lo cual, se colocaron 20 discos de 6 mm de micelio en crecimiento activo en medio PDA de cultivos de 5 días de desarrollo, se selló la tapa con parafilm y se colocaron a 4 °C (Ryan *et al.*, 2012).

Prueba de patogenicidad

Los postulados de Koch para los aislados seleccionados se efectuaron en frutos sanos de papaya *cv.* Maradol en estado de madurez comercial; inicialmente, los frutos se desinfestaron con alcohol etílico al 70% y después se lavaron con agua destilada. Cada aislado se inoculó en 3 frutos, seleccionado tres sitios de inoculación por cada uno, en donde se realizaron heridas con una aguja estéril y se inocularon por aspersión con una suspensión de esporangiosporas a una concentración de 5×10^5 esporangiosporas/mL; adicionalmente, se incluyeron 3 frutos sanos sin heridas y asperjados con

plates and monosporic cultures were then obtained (Chukwuka *et al.*, 2010; Suárez-Quiroz *et al.*, 2013). The isolates were preserved in glass tubes with sterile distilled water, and for this 20 discs of 6 mm diameter of mycelium in active growth were placed in a PDA medium from 5-day old cultures. The lid was sealed with parafilm, and they were placed at 4 °C (Ryan *et al.*, 2012).

Pathogenicity test

Koch's postulates for selected isolates were carried out on healthy *cv.* Maradol papaya fruits in a commercially ripe state; initially, the fruits were disinfested with ethyl alcohol at 70% and then washed with distilled water. Each isolate was inoculated in 3 fruits, selecting three inoculation sites for each one, where incisions were made using a sterile needle and they were inoculated by spraying a sporangiospore solution at a concentration of 5×10^5 sporangiospores/mL. In addition, 3 healthy fruits were included, all free of lesions and sprayed with the same sporangiospore solution and 3 control fruits, on which lesions were made and which were sprayed with sterile distilled water only. All fruits were placed in polyethylene bags (three fruits per bag), with paper towels dampened with sterile distilled water to produce a relative humidity of about 80%, and they were incubated at 25 °C for 5 days. Finally, the fungus was reisolated from the lesions and the morphological characteristics were confirmed with the fungus inoculated at the beginning of the experiment (Beales, 2012).

Morphological Characterization.

The macroscopic and microscopic cultural characteristics of the isolates grown in PDA were recorded. For this purpose, preparations were made and stained with lactophenol blue-cotton,

la misma concentración de esporangiosporas y 3 frutos control, los cuales fueron heridos y se asperjaron sólo con agua destilada estéril. Todos los frutos se colocaron dentro de bolsas de polietileno (tres frutos por bolsa), con toallas absorbentes humedecidas con agua destilada estéril para generar aproximadamente 80% de humedad relativa y se incubaron a 25 °C durante 5 días. Finalmente, el hongo se reisoló de las lesiones y las características morfológicas se confirmaron con el hongo inoculado al inicio del experimento (Beales, 2012).

Caracterización morfológica

Se registraron las características culturales macroscópicas y microscópicas de los aislados crecidos en PDA; para lo cual se realizaron preparaciones teñidas con azul de lactofenol-algodón y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss Imager A2, Alemania). Los apéndices de esporangiosporas y espinas de esporangios se observaron en un microscopio de contraste de interferencia diferencial (Leica DMI 6000 B, Alemania) acoplado con una cámara (Leica DFC450C). Se registró la medida de 100 estructuras morfológicas, las cuales incluyeron: diámetro y patrón de ramificación de esporangióforo, tamaño y forma de esporangios y esporangiosporas, columela y clamidosporas, tamaño y presencia/ausencia de apéndices, así como el tipo de micelio (Campbell *et al.*, 2013).

Tasa de desarrollo micelial

En el centro de cajas petri de 90 mm de diámetro con medio PDA, se colocó un disco de 6 mm proveniente del margen de colonias fúngicas de los aislados crecidos durante 3 días en PDA, y se incubaron a 4, 10, 15, 25 y 40 °C. El diámetro de la colonia se registró diariamente hasta que cubrió la totalidad de la placa, posteriormente, se efectuó la

and observed under an optic microscope (Carl Zeiss Imager A2, Germany). The appendages of sporangiospores and sporangial spines were observed using a differential interference contrast microscope (Leica DMI 6000 B, Alemania) connected to a camera (Leica DFC450C). The measurement of 100 morphological structures was recorded, and included the diameter and branching pattern of sporangiophores, columellae and chlamydospores, size and presence/absence of appendages, as well as the type of mycelium (Campbell *et al.*, 2013).

Mycelial development rate

In the center of petri dishes, 90 mm in diameter and containing PDA, a 6 mm disc was placed, taken from the edge of fungal cultures of the isolates grown for 3 days in PDA, and they were incubated at 4, 10, 15, 25, and 40°C. The diameter of the culture was recorded on a daily basis until it covered the entire plate. Later, a relation was made between the diameter and the number of days of the test (Michailides, 1991).

Molecular Characterization

Extraction of DNA, amplification with PCR and sequencing. Each isolate's mycelium was produced in a PDA medium for two days at 27 °C; later, it was collected with a sterilized slide and the genomic DNA was extracted according to the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method, following the procedure described by Voigt *et al.* (1999) with slight modifications: briefly, 30 mg of mycelia were placed in 1.5 mL microcentrifuge tubes and 700 µL of CTAB buffer solution were added [100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 25 mM of EDTA, 2% CTAB], it was macerated and placed in a vortex for 10 s. Next, 700 µL of

relación del diámetro con el número de días de la prueba (Michailides, 1991).

Caracterización molecular

Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación. El micelio de cada aislado se produjo en medio PDA durante dos días a 27 °C; posteriormente, se colectó con un portaobjetos estéril y el ADN genómico se extrajo de acuerdo al método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) siguiendo el protocolo descrito por Voigt *et al.* (1999) con ligeras modificaciones: brevemente, se colocó 30 mg de micelio en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 700 µL de solución amortiguadora CTAB [100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 25 mM de EDTA, 2% CTAB], se maceró y se colocó en vórtex por 10 s; posteriormente, se agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich) por tubo, se sometió a vórtex por 10 s y se centrifugó a 12,300 x g durante 10 min. Se recuperó una porción de 500 µL de la fase superior y se colocó en un nuevo tubo; se agregó una cantidad igual de isopropanol (Sigma-Aldrich) a -20 °C, y se mezcló suavemente; posteriormente, se centrifugó de nuevo a 12,300 x g durante 2 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 12,300 x g durante 2 min. Se descartó el etanol y se permitió su evaporación por completo. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 200 µL de solución amortiguadora Tris EDTA [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)].

La amplificación se realizó de acuerdo con Walther *et al.* (2013), en el cual el ADN ribosomal, incluyendo la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S (LSU), se amplificaron con el par de oligonucleótidos V9G (5'-

choloform-isoamylic alcohol was added (24:1) (Sigma-Aldrich) per tube; it was vortexed for 10 s and centrifuged at 12,300 x g for 10 min. A 500 µL portion of the top section was recovered and placed in a new tube; the same amount of isopropanol (Sigma-Aldrich) was added at -20 °C, and mixed softly. Later, it was centrifuged again at 12,300 x g for 2 min and the supernatant was discarded. The DNA pellet was washed with 500 µL of ethanol at 70%, centrifuged at 12,300 x g for 2 min. The ethanol was discarded and allowed to evaporate completely. Finally, the pellet was resuspended in 200 µL of Tris EDTA buffer solution [10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)].

Amplification was carried out in accordance with Walther *et al.* (2013), where ribosomal DNA, including the complete region of ITS1-5.8S-ITS2 and the region D1/D2 of the subunit 28S (LSU) were amplified with the pair of oligonucleotides V9G (5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') (de Hoog y van den Ende, 1998), and LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3') (Vilgalys and Hester, 1990). The mixture of the PCR reaction (25 µl), included 20 ng of ADN, 0.4 µM of each oligonucleotide, 0.185 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 5X reaction buffer, 1.5 mM of MgCl₂ and 0.8 U of the enzyme Taq ADN polymerase using the kit GoTaq® PCR Core Systems (Promega, USA). The amplification reaction was carried out in a BioRad T100™ (Singapore) thermocycler, with the following cycles: an initial step of denaturalization for 5 min at 94 °C, followed by 35 one minute cycles at 94 °C, 1 min at 53 °C, and 2 min at 72 °C, with a final extension of 7 min at 72 °C. To observe the bands of the amplified DNA products, the products were run in agarose gel at 0.8%, stained with ethidium bromide. The estimation of the molecular weights of the amplified products was carried out by comparison with a 1 Kb molecular

TTACGTCCCTGCCCTTTGTA- 3') (de Hoog y van den Ende, 1998) y LR3 (5'-GGTCCGTGTTT-CAAGAC- 3') (Vilgalys y Hester, 1990). La mezcla de reacción de PCR (25 µl), incluyó 20 ng de ADN, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.185 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 5X amortiguador de reacción, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.8 U de la enzima Taq ADN polimerasa utilizando el kit GoTaq® PCR Core Systems (Promega, USA). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador marca BioRad T100™ (Singapur), con los siguientes ciclos: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 2 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. Para visualizar las bandas de los productos de ADN amplificados, los productos se corrieron en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. La estimación de los pesos moleculares de los productos amplificados se realizó por comparación con un marcador molecular de 1 Kb (Promega, USA); posteriormente, la visualización de los productos amplificados se realizó en un fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BioRad, USA).

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV unidad Irapuato, utilizando para la región ITS, los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(White *et al.*,1990), y para la región D1/D2 28S (LSU) los oligonucleótidos NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') (O'Donnell, 1993) y LR3 (Vilgalys y Hester, 1990), el proceso de secuenciación se realizó para ambos sentidos del amplicón.

marker (Promega, USA). Afterwards, the amplified products were viewed using a Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ photodocumenter (BioRad, USA). PCR products were purified using the Wizard® SV Gel kit and the PCR Clean-Up System (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out in the National Genomics Laboratory for Biodiversity, CINVESTAV Irapuato, using oligonucleotides ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*,1990) for the ITS region, and for region D1/D2 28S (LSU), oligonucleotides NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') (O'Donnell, 1993) and LR3 (Vilgalys and Hester, 1990); the sequencing process was carried out for both directions of the amplicon.

Phylogenetic analysis of the sequences.

The sequences were edited using the program Bioedit Sequence Alignment Editor, version 7.2.5. (Hall, 1999). The alignment was carried out using the program ClustalW, and the consensus sequences obtained were compared with the basic local alignment search tool BLASTN of the NCBI (National Center for Biotechnology Information). To perform the evolutionary analyses, the sequences obtained were saved in the FASTA format, and the alignment was carried out using the program ClustalW included in the software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood Method, based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei,1993). The graphic representation of the dendrogram based on region ITS and 28S (LSU) was carried out with the Neighbor-Joining method, with a bootstrap analysis of 1000 repetitions to determine the trust values for the clades (Felsenstein, 1985), using reference strains available from the GenBank of the NCBI.

Análisis filogenéticos de las secuencias

La edición de las secuencias se realizó con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versión 7.2.5. (Hall, 1999). El alineamiento se llevó a cabo con el programa ClustalW y las secuencias consenso obtenidas se compararon con la herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para realizar los análisis evolutivos, las secuencias obtenidas fueron guardadas en formato FASTA y el alineamiento se realizó con el programa ClustalW incluido en el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). La historia evolutiva fue inferida usando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood Method), basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). La representación gráfica del dendrograma con base en la región ITS y 28S (LSU) se realizó por la aplicación del método Neighbour-Joining, con un análisis bootstrap de 1000 repeticiones para determinar los valores de confianza para los clados (Felsenstein, 1985), utilizando cepas de referencia disponibles en GenBank del NCBI.

RESULTADOS

De los 4 trozos sembrados por fruto enfermo, un 100% correspondió al hongo reportado para cada caso. Se obtuvieron 28 aislados asociados a pudrición blanda en frutos de papaya, 4 de Colima, 23 de Veracruz y 1 de Oaxaca. Todos los aislados se caracterizaron morfológicamente y se depositaron en el cepario de hongos del laboratorio de Fitopatología de CIAD. Los aislados de Colima, el de Oaxaca y 5 representativos de Veracruz se seleccionaron para evaluar patogenicidad y caracterizarlos molecularmente (Cuadro 1).

RESULTS

Out of the 4 pieces plated for every diseased fruit, 100% corresponded to the fungus reported for each case. Twenty eight isolates were obtained, related to soft rot in papaya fruits, 4 from Colima, 23 from Veracruz, and 1 from Oaxaca. All isolates were characterized morphologically and deposited in the fungal collection of the CIAD Plant Pathology Laboratory. The isolates from Colima, Oaxaca, and 5 representative from Veracruz were selected for the evaluation of pathogenicity and molecular characterization (Table 1).

Pathogenicity tests

All Maradol papaya fruits inoculated through lesions with the mucoralean species presented, 24 h after inoculation, symptoms that included humid-looking lesions of approximately 1 cm in diameter; white mycelia developed 48 h later, and after 72 h, sporangia were produced. Finally, 5 d after inoculation, the development of abundant light to dark brown mycelia and sporangia (Figures 1E and 1C), and gray to black (Figures 1D and 1F) was observed. By contrast, the fruits without lesions did not show symptoms of disease (Figures 1B and 1G). Internal damage in the infected fruit consisted of a soft rot that caused detachment of tissues (Figure 1H).

Morphological characteristics of *Mucor irregularis*

Cultures from isolation HP160, identified as *M. irregularis*, were circular, uniform, and with abundant, pale yellow aerial mycelia (Figure 2A), a color which was also observed on the reverse side of the plate (Figure 2B). The rate of mycelial growth was 1.48 cm/day at 25 °C; it did not develop

Cuadro 1. Especies de hongos mucorales causantes de pudrición blanda en frutos de papaya. Cada cepa (clave de cepario HP “Hongo Papaya”) corresponde al hongo obtenido de los 4 trozos de tejido sembrados en PDA por fruto enfermo.
Table 1. Species of mucoralean fungi causing soft rot in papaya fruits. Each strain (fungal collection code HP “Papaya Fungus”) corresponds to the fungus obtained from the 4 pieces of tissue plated in PDA per diseased fruit.

Localidad	Entidad	Frutos	Colonias Mucorales	Especie	Aislamiento	Colonias de otros hongos
El Trébol	Colima	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP09 ^x	-
El Trébol	Colima	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP15 ^x	-
El Trébol	Colima	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP19 ^x	-
El Trébol	Colima	1	4/4	<i>R. oryzae</i>	HP25 ^x	-
San José Río Verde Jamiltepec	Oaxaca	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP114 ^x	-
El Diamante Cotlaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>M. irregularis</i>	HP160 ^x	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP162	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP165	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP167 ^x	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP169	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP170	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP171	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP172	-
El Diamante Cotaxtla	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP173	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP178 ^x	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP179	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP182	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP183 ^x	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP192	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP197	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP199	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP210	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP211 ^x	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP226	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP231	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP235	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP236	-
Tlalixcoyan	Veracruz	1	4/4	<i>G. persicaria</i>	HP240	-

^xaislados representativos utilizados en la caracterización molecular / ^xrepresentative isolates used in molecular characterization.

Pruebas de patogenicidad

Todos los frutos de papaya *cv.* Maradol inoculados a través de heridas con las especies de mucorales presentaron, a las 24 h después de la inoculación, el desarrollo de síntomas que incluían lesiones de apariencia húmeda de aproximadamente 1 cm de diámetro; posteriormente, se desarrolló micelio de color blanco a las 48 h, y a las 72 h

at 4 °C, but it did between 10 and 40 °C (Table 2). The sporangiophores, mostly not branched, presented globular sporangia on their tips, of less than 80 µm, and which contained hundreds of elliptical sporangiospores inside them (Figure 2E and 2C). The columella with an almost spherical hyaline appearance presented a collarete, remanent of the sporangial wall (Figure 2D).

se produjeron esporangios; finalmente, a los 5 d después de inoculación, se observó el desarrollo de abundante micelio y esporangios de color café claro a oscuro (Figura 1E y 1C) y de gris a negro (Figura 1D y 1F). En contraste, los frutos sin heridas y testigo con heridas no mostraron síntomas de enfermedad (Figura 1B y 1G). El daño interno en los frutos infectados consistió en una pudrición blanda que ocasionó desprendimiento de tejidos (Figura 1H).

Características Morfológicas de *Mucor irregularis*.

Las colonias del aislamiento HP160, identificado como *M. irregularis*, fueron circulares, uniformes y con abundante micelio aéreo de color amarillo pálido (Figura 2A); color que de igual manera

Morphological characteristics of *Gilbertella persicaria*

G. persicaria displayed two types of cultural morphology (Figures 3A and 3E). In the first one, the culture is petaloid with yellow to brown sporangia (Figure 3C), and with a mycelial growth of 1.48 cm/day at 25 °C (strains HP09 and HP114), whereas the second type presents circular cultures, with a more dense mycelia and gray to black sporangia (Figures 3G and 3H), with a mycelial growth rate of 2.46 cm/día (HP15, HP19, HP167, HP178, HP183 and HP211). None of the strains grew at 4 °C, although they did show development between 10 and 40 °C. Other characteristics in *G. persicaria* include the release of sporangiospores by the breaking of the sporangial wall in two

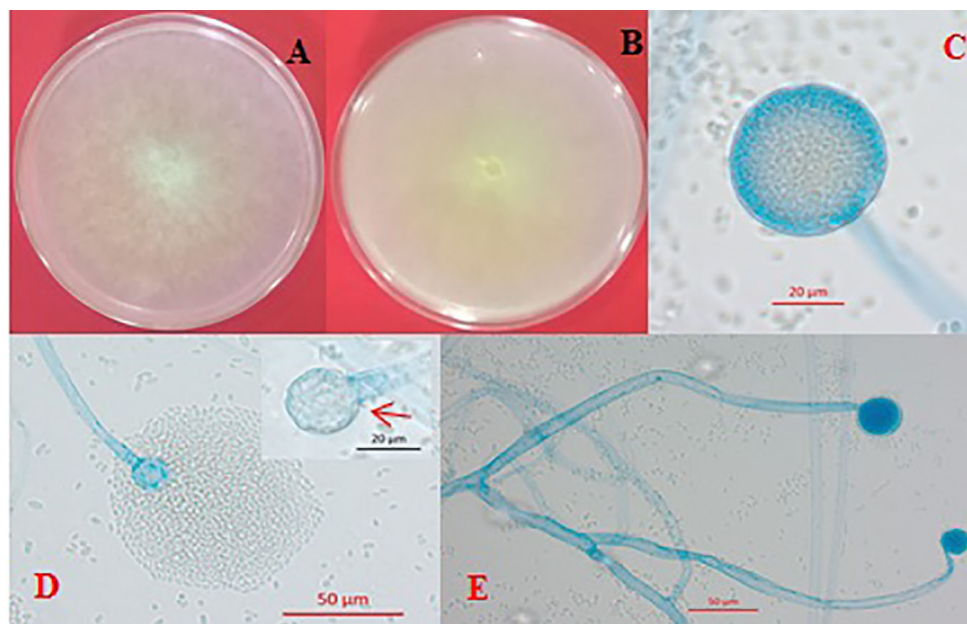


Figura 2. Características morfológicas de *Mucor irregularis*. (A) Desarrollo micelial circular de color amarillo pálido y abundante micelio aéreo, (B) Placa invertida mostrando una coloración amarillo claro, (C) Esporangio globoso con esporangiosporas, (D) Liberación de esporangiosporas y presencia de columella con forma casi esférica y collarete característico y, (E) Esporangióforos hialinos no ramificados.

Figure 2. Morphological characteristics of *Mucor irregularis*. (A) Circular, pale yellow mycelial growth and abundant aerial mycelia, (B) Inverted plate showing a light-yellow color, (C) Globose sporangium with sporangiospores, (D) Release of sporangiospores and presence of columella with an almost spherical shape and a distinctive collarette, and (E) Non-branched hyaline sporangiophores.

se observó al reverso de la placa (Figura 2B). La tasa de desarrollo micelial fue de 1.48 cm/día a 25 °C, no se desarrolló a 4 °C, pero sí entre 10 y 40 °C (Cuadro 2). Los esporangióforos, en su mayoría no ramificados, presentaron en la punta esporangios globosos, menores a 80 µm, que contenían en su interior cientos de esporangiosporas elípticas (Figura 2E y 2C). La columela de apariencia hialina casi esférica presentó un collarite remanente de la pared esporangial (Figura 2D).

Características morfológicas de *Gilbertella persicaria*

G. persicaria mostró dos tipos de morfología colonial (Figura 3A y 3E). En el primer tipo, la colonia es petalada con esporangios amarillo a café

halves (Figure 3I), the presence of small hyalin spines in the walls of the sporangia (Figure 3K), and the presence of hyaline appendages in the sporangiospores (Figure 3J). In the microscopic structures of both types of cultures, no relevant morphological differences were observed (Table 2). The sporangiophores are scarcely branched (four to six in every 100 analyzed); the ovoidal columella with a residual collarite, and cylindrical chlamydospores (Figure 3D), abundant in PDA in 5-day-old cultures.

Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae* (syn. *R. arrhizus*)

Cultures of strain HP25 identified as *Rhizopus oryzae* showed an abundance of initially white aerial

Cuadro 2. Características morfológicas de especies de mucorales aislados de frutos de papaya con pudrición blanda. Las medidas mostradas se realizaron a partir de cultivos en PDA e incubados a 27 °C.

Table 2. Morphological characteristics of mucoralean species isolated from papaya fruits with soft rot. The measurements shown were carried out from cultures in PDA and incubated at 27 °C.

Característica	<i>Gilbertella persicaria</i> Morfofoto 1	<i>G. persicaria</i> Morfofoto 2	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Morfología Colonial	Petalada	Circular	Circular	Circular
Tasa de desarrollo micelial	1.48 cm/día	2.46 cm/día	1.48 cm/día	2.46 cm/día
Color de esporangios	Amarillo-café	Gris-negro	Café claro	Café-oscuro a negro
Esporangio ^x	84.62 µm (64.77-139.7)	88.20 µm (49.91-169.49)	49.3 µm (24.95-72.02)	112.5µm (48.17-198.67)
Columela ^x	50.964 µm (36.86-84.39) x 42.58 µm (35.6-78.56)	65.27 µm (18.4-97.96) x 42.66 µm (14.75-79.13)	24.7 µm (10.53-47.99) x 23.35 µm (8.63-44.02)	68.91µm (137.02-33.41) x 67.62µm (112.72-25.7)
Clamidospora ^x	35.72 µm (15.58-37.55) x 22.42 µm (11.64-29.84)	35.37 µm (19.13-69.87) x 19.65 µm (11.38-27.8)	No se observó	No se observó
Esporangiospora ^x	8.53 µm (5.54-10.99) x 6.72 µm (4.43-9.06)	7.69 µm (6.05-11.007) x 6.43 µm (4.59-9.22)	4.77 µm (3.12-8.7) x 2.77 µm (1.79-4.68)	7.99µm (5.52-11.31) x 6.17µm (4.52-7.66)
Diámetro de esporangióforo ^x	24.12 µm (12.33-32.47)	20.03 µm (9.18-28.93)	11.47 µm (4.99-17.09)	10.13µm (6.38-17.77)
Temperaturas cardinales	10, 25 y 40 °C	10, 25 y 40 °C	10, 25 y 40 °C	15, 25 y 40 °C
Patrón de ramificación	Escasamente ramificado (4)	Escasamente ramificado (6)	Escasamente ramificado (4)	No ramificado

^xValores promedio y rangos en paréntesis (n=100) / ^xAverage values and ranges in parentheses (n=100).

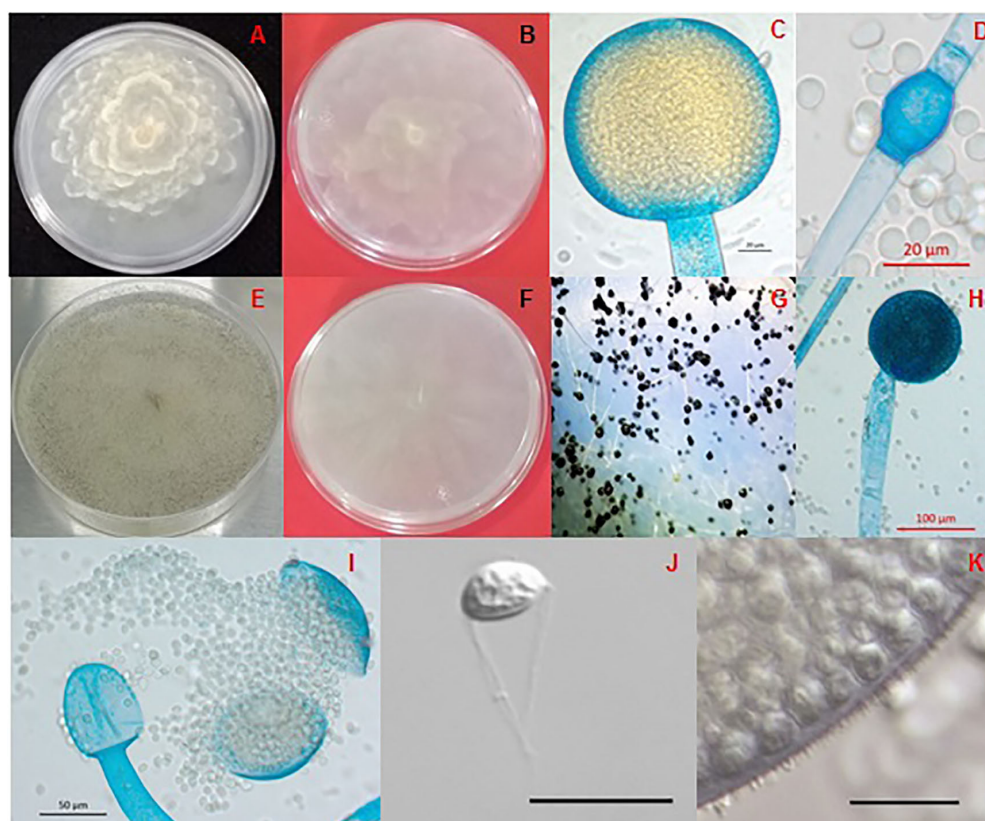


Figura 3. Características morfológicas de *Gilbertella persicaria*. (A) Colonia en PDA con desarrollo micelial irregular en colonias petaladas, (B) Reverso del cultivo, (C) Esporangio globoso multiesporado de color amarillo-café, (D) Clamidospora cilíndrica, (E) Cultivo en PDA con desarrollo micelial circular, (F) Reverso del cultivo, (G) Esporangios negros, (H) Esporangio maduro globoso multiesporado de color oscuro, (I) Apertura de la pared esporangial en dos mitades mostrando la columela ovoide, (J) Esporangiospora con apéndices hialinos polares, (K) Pared esporangial cubierta de pequeñas espinas hialinas. Figuras (J y K) barra=20 µm.

Figure 3. Morphological characteristics of *Gilbertella persicaria*. (A) Culture in PDA with irregular mycelial growth in petaloid colonies, (B) Reverse side of the culture, (C) Yellowish-brown, multispored globose sporangium, (D) Cylindrical chlamydospore, (E) Culture in PDA with a circular mycelial growth, (F) Reverse side of the culture, (G) Black sporangia, (H) Dark mature multispored globose sporangium, (I) Opening of the sporangial wall in two halves, showing the ovoidal columella, (J) Sporangiospore with polar hyalin appendages, (K) Sporangial wall covered with small hyalin spines. Figures (J and K) bar=20 µm.

(Figura 3C) y con un desarrollo micelial de 1.48 cm/día a 25 °C (cepas HP09 y HP114); mientras que, el segundo tipo presenta colonias circulares, con micelio más denso y coloración de esporangios de gris a negro (Figura 3G y 3H), con una tasa de desarrollo micelial de 2.46 cm/día (HP15, HP19, HP167, HP178, HP183 y HP211). Ninguna de las cepas se desarrollaron a 4 °C, pero si mostraron desarrollo

mycelia that later turned grayish (Figure 4A and 4B), dark brown to black sporangia that contained sporangiospores with a striated appearance (Figure 4C and 4E). Upon the release of sporangiospores, the light brown globular columella was observed (Figure 4D). The sporangiophores emerge from basal rhizoids (Figure 4F). *R. oryzae* presented a mycelial growth of 2.46 cm/day at 25 °C; it did not

entre 10 a 40 °C. Otras características en *G. persicaria* incluyen la liberación de esporangiosporas por medio de la ruptura de la pared esporangial en dos mitades (Figura 3I), la presencia de pequeñas espinas hialinas en la pared de los esporangios (Figura 3K) y la presencia de apéndices hialinos en las esporangiosporas (Figura 3J). En las estructuras microscópicas de los dos tipos de colonias, no se observaron diferencias morfológicas relevantes (Cuadro 2). Los esporangióforos son escasamente ramificados (de cuatro a seis por cada 100 analizados), la columela ovoide con un collarite residual y, clamidosporas cilíndricas (Figura 3D) abundantes en PDA en cultivos de 5 días.

Características morfológicas de *Rhizopus oryzae* (syn. *R. arrhizus*)

Las colonias de la cepa HP25 identificada como *Rhizopus oryzae* mostró abundante micelio aéreo de color blanco en un inicio y posteriormente grisáceo (Figura 4A y 4B), esporangios de color café oscuro a negro que contenían esporangiosporas de apariencia estriada (Figura 4C y 4E). Al liberarse las esporangiosporas se observó la columela globosa de color café claro (Figura 4D). Los esporangióforos emergen a partir de rizoides basales (Figura 4F). *R. oryzae* mostró desarrollo micelial de 2.46 cm/día a 25 °C, no se desarrolló a 4 °C, pero sí entre 15 y 40 °C (Cuadro 2).

Identificación molecular

La reacción de amplificación con los oligonucleótidos V9G y LR3, generó un fragmento aproximado de 1500 pb, que incluyó la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y la región D1/D2 de la subunidad 28S (LSU) ribosomal. Las secuencias consenso obtenidas variaron para la región ITS1-5.8S-ITS2 de 543 a 751 pb y para la región parcial de la subunidad 28S (LSU) ribosomal de 632 a 711 pb.

grow at 4°C, but it did between 15 and 40°C (Table 2).

Molecular identification

The reaction of amplification with the oligonucleotides V9G and LR3 generated an approximate fragment of 1500 pb, which included the complete region of ITS1-5.8S-ITS2 and the region D1/D2 of the ribosomal subunit 28S (LSU). The consensus sequences obtained varied for the region ITS1-5.8S-ITS2 from 543 to 751 pb and for the partial region of ribosomal subunit 28S (LSU) from 632 to 711 pb.

The comparison in the data base showed, for the sequencing of the strain HP160 (Access N° KR076763 and KR076764), a percentage of identity of 99% and 96% for the region ITS with strains identified as *Mucor* sp. (Access N° HM770967 and KP714393, respectively), showing an identity of 91% with the strain of *M. irregularis* (Access N° JX976251) (Figure 5). However, for the partial ribosomal region 28S (LSU), it showed an identity of 99% with different strains of *M. irregularis*, which show an alignment of 100% (Figure 6).

The comparison of the sequences of the region ITS1-5.8S-ITS2 of the strains HP09, HP15, HP19, HP114, HP167, HP178, HP183, and HP211 showed an identity of 100% with sequences deposited in the NCBI (Access N° JN206224 y KC683539) of the species *G. persicaria*, where we can observe in the phylogenetic analysis the formation of two groups that correspond to the two morphotypes found (Figure 5). The confirmation of this species was carried out by analyzing the sequences of the partial ribosomal region 28S (LSU) (Table 1), which also showed an identity of 100% with the strains (Access N° JN206517 and JN939197) of *G. persicaria*. Finally, the comparison of the sequence of the strain HP25 of the region ITS1-5.8S-ITS2 and partial region 28S (LSU) (Access N° KT899481

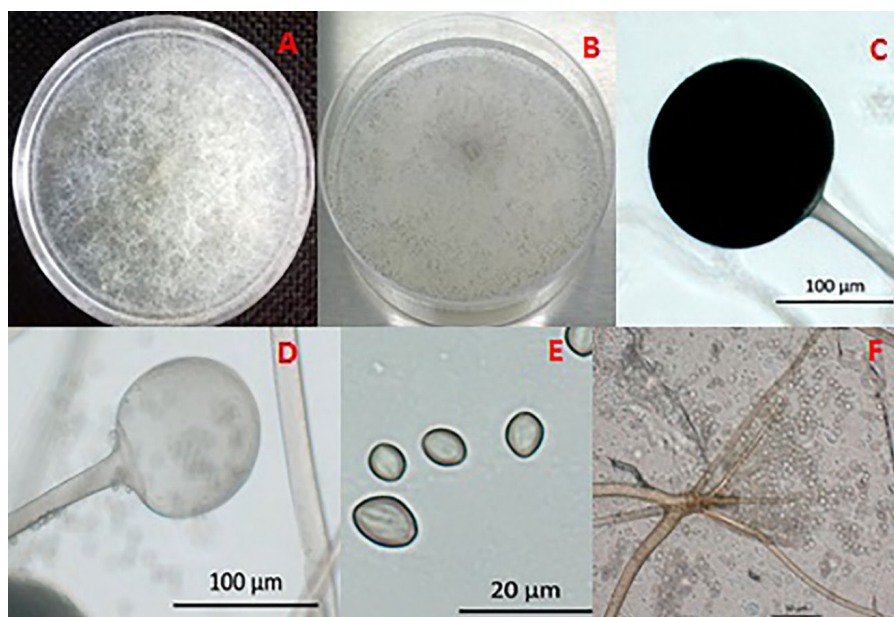


Figura 4. Características morfológicas de *Rhizopus oryzae*. (A) Colonia en PDA con abundante micelio algodonoso, (B) Colonia con esporangios negros, (C) Esporangio globoso multiesporado de color negro, (D) Columela de subglobosa a globosa, (E) Esporangiosporas de apariencia estriada y (F) Rizoide basal.

Figure 4. Morphological characteristics of *Rhizopus oryzae*. (A) Culture in PDA with abundant cotton-like mycelia, (B) Culture with black sporangia, (C) Black multisporous globose sporangium, (D) Subglobose to globose columella, (E) Sporangiospores with a striated appearance, and (F) Basal rhizoid.

La comparación en la base de datos mostró para la secuencia de la cepa HP160 (N° Accesos KR076763 y KR076764), un porcentaje de identidad de 99% y 96% para la región ITS con cepas identificadas como *Mucor sp.* (N° Acceso HM770967 y KP714393, respectivamente); mostrando 91% de identidad con la cepa de *M. irregularis* (N° Acceso JX976251) (Figura 5); sin embargo, para la región parcial 28S (LSU) ribosomal mostró un 99% de identidad con diferentes cepas de *M. irregularis*, las cuales muestran un alineamiento en un 100% (Figura 6).

La comparación de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas HP09, HP15, HP19, HP114, HP167, HP178, HP183 y HP211, mostraron 100% de identidad con secuencias depositadas en el NCBI (N° de Acceso JN206224 y KC683539)

and KT899482) showed an identity of 100% with sequences published in the NCBI (Access N° KJ417552 and AY213624), respectively, of the species *R. oryzae* (Figure 5). The coverage of the consultations of all the consensus sequences in the NCBI data base varied between 91 and 100%.

DISCUSSION

In Mexico, the identification of plant pathogenic mucoralean species is scarce. The results of this study, focused on using morphological and molecular techniques to identify fungi, showed the presence of three species of mucorales related to the soft rot of papaya fruits. The symptoms produced in papaya fruits were similar to those reported

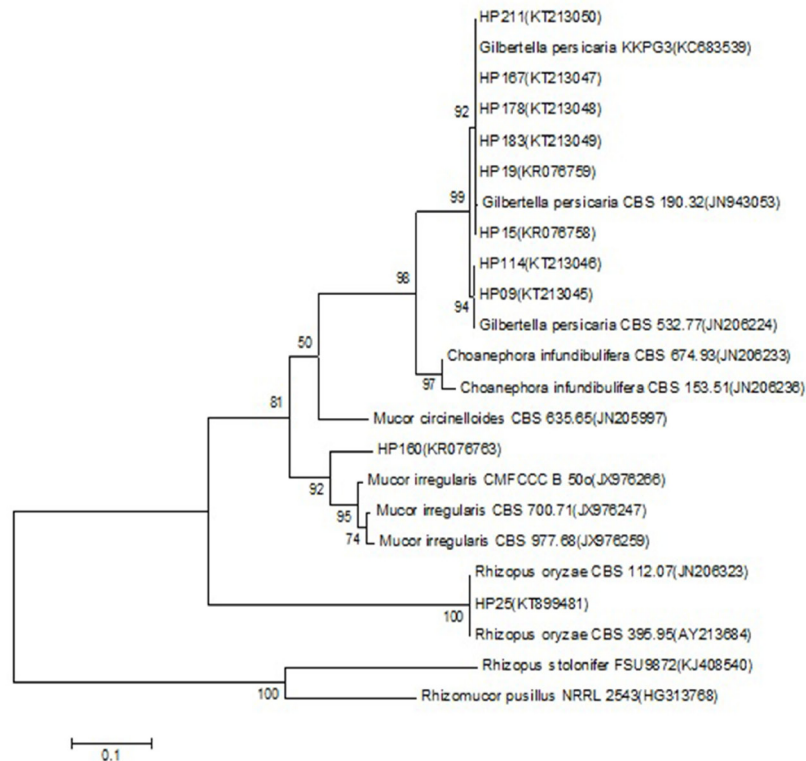


Figura 5. Dendrograma basado en el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2 de aislados de especies de Mucorales y de cepas de referencia de NCBI, los N° de acceso se encuentran entre paréntesis. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. *Rhizomucor pusillus* se utilizó como outgroup. La escala representa el número de sustituciones por sitio.

Figure 5. Dendrogram based on the method of highest verosimilitude from sequences obtained for the region ITS1-5.8S-ITS2 of isolations of species of Mucorales and NCBI reference strains; the Access N° are in parentheses. The probability values of the nodes for each clade indicate the percentage of the replications of the analysis of 1000 bootstraps that support that clade. *Rhizomucor pusillus* was used as an outgroup. The scale represents the number of substitutions per site.

de la especie *G. persicaria*, donde se observa en el análisis filogenético la formación de dos grupos que corresponden a los dos morfotipos encontrados (Figura 5). La confirmación de esta especie se realizó con el análisis de las secuencias de la región parcial 28S (LSU) ribosomal (Cuadro 1), que de igual manera mostró 100% de identidad con las cepas (N° Acceso JN206517 y JN939197) de *G. persica-*

for peach, pear, and apple fruits (Michailides and Spotts, 1990), with initially soft lesions with an aqueous appearance, and that in a brief period of time become covered with mycelial masses. The symptom of soft rot observed in fruits is mainly due to the production of enzymes such as amylases, lipases, polygalacturonases, and proteases, which contribute in the degradation of structural and

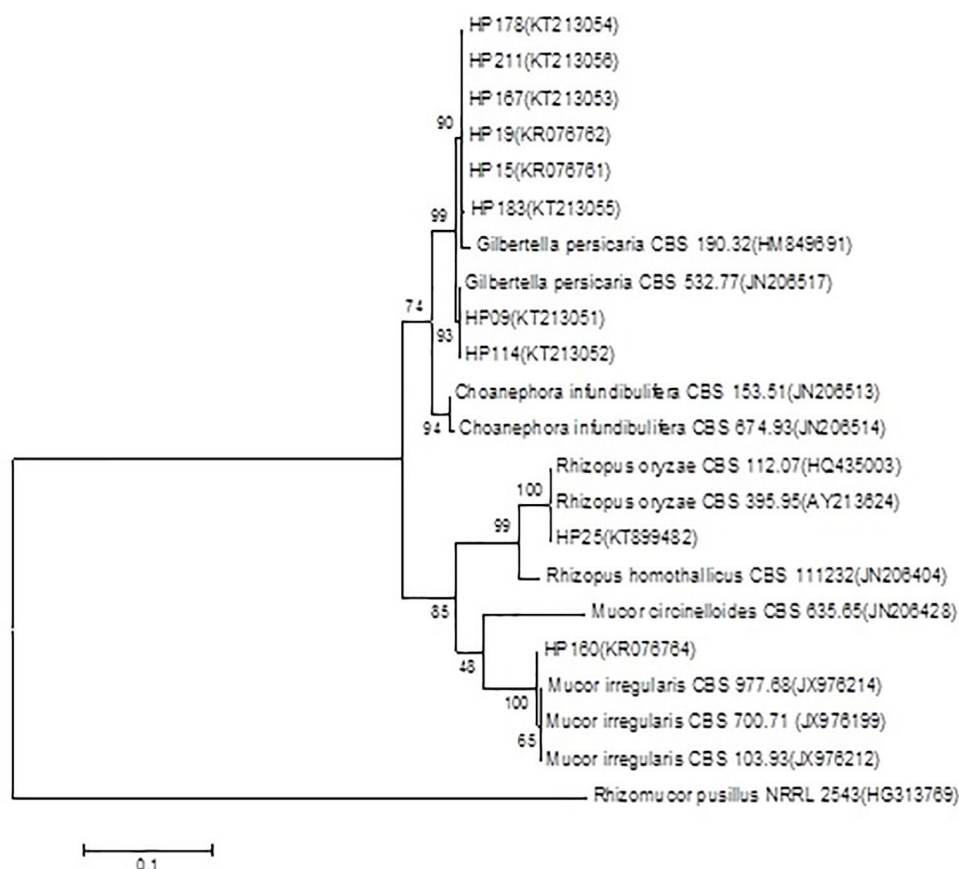


Figura 6. Dendrograma basado en el método de máxima verosimilitud a partir de la región 28S (LSU) para la cepa HP160 y cepas de referencia de NCBI, los N° de acceso se encuentran entre paréntesis. Los valores de probabilidad de los nodos para cada clado indican el porcentaje de las réplicas del análisis de 1000 bootstraps que soportan ese clado. *Rhizomucor pusillus* se utilizó como outgroup. La escala representa el número de sustituciones por sitio.

Figure 6. Dendrogram based on the method of highest verosimilitude from the region 28S (LSU) for the strain HP160 and NCBI reference strains; the Access N° are in parentheses. The probability values of the nodes for each clade indicate the percentage of the replications of the analysis of 1000 bootstraps that support that clade. *Rhizomucor pusillus* was used as an outgroup. The scale represents the number of substitutions per site.

ria. Finalmente, la comparación de la secuencia de la cepa HP25 de la región ITS1-5.8S-ITS2 y parcial 28S (LSU) (N° de Acceso KT899481 y KT899482) mostró 100% de identidad con secuencias publicadas en el NCBI (N° de Acceso KJ417552 y AY213624), respectivamente, de la especie *R. oryzae* (Figura 5). La cobertura de las consultas de todas las secuencias consenso en la base de datos de NCBI varió de 91 a 100%.

storage polysaccharides (Alves *et al.*, 2002; Krisch *et al.*, 2010).

The morphological characteristics of *M. irregularis* correspond with descriptions by different authors (Walther *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015). It is important to mention that, considering that the genus *Mucor* is polyphyletic, the ITS region was insufficient to discriminate between widely related species, therefore the species was

DISCUSIÓN

En México, la identificación de especies de mucorales fitopatógenos es escasa. Los resultados de este estudio enfocado en utilizar técnicas morfológicas y moleculares para identificación de hongos evidenció la presencia de tres especies de mucorales asociados a pudrición blanda de frutos de papaya. Los síntomas causados en frutos de papaya fueron similares a los reportados en frutos de durazno, pera y manzana (Michailides y Spotts, 1990), con lesiones iniciales suaves y de apariencia acuosa, y que en un corto periodo de tiempo se cubren de masas de micelio. El síntoma de pudrición blanda observada en frutos se debe principalmente, a la producción de enzimas como amilasas, lipasas, poligalacturonasas y proteasas, las cuales contribuyen en la degradación de los polisacáridos estructurales y de almacenamiento (Alves *et al.*, 2002; Krisch *et al.*, 2010).

Las características morfológicas de *M. irregularis* concuerdan con lo descrito por diversos autores (Walther *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015). Es necesario mencionar que, considerando que el género *Mucor* es polifilético, la región ITS fue insuficiente para discriminar entre especies estrechamente relacionadas, por lo que la confirmación de especie se realizó con el análisis filogenético de la región 28S (LSU) (Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013; Hyde *et al.*, 2014). *M. irregularis* recientemente fue reportado como fitopatógeno en maíz (Peng *et al.*, 2015). Éste se considera un primer reporte de *M. irregularis* afectando papaya.

La morfología de las estructuras de *G. persicaria* es similar a la reportada por diversos autores (Benny, 1991; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014); es considerada una especie monotípica en su género, el cual se ubica en la subfamilia *Gilbertelloideae* y familia *Choanephoraceae* (Hyde *et al.*, 2014). En este estudio se observó el desarrollo de

confirmado with the phylogenetic analysis of region 28S (LSU) (Walther *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013; Hyde *et al.*, 2014). *M. irregularis* was recently reported as pathogenic in maize (Peng *et al.*, 2015). This is considered a first report of *M. irregularis* affecting papaya.

The morphology of *G. persicaria* structures is similar to that reported by diverse authors (Benny, 1991; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014). It is considered a monotypic species in its genus, which is located in the subfamily *Gilbertelloideae* and the family *Choanephoraceae* (Hyde *et al.*, 2014). This study observed the development of two morphotypes, which have been defined by Lacap *et al.* (2003) as strains of the same species that display differences in culture morphologies and rate of mycelial growth, which was confirmed with the separation in clades in the dendrogram of both the ITS and 28S regions (Figures 5 and 6). Morphotype 1 (petaloid colonies, brown sporangia) was observed in 31% of the isolates, while the rest of the isolates presented morphotype 2 (69%). *G. persicaria* is a common pathogen in tropical and subtropical regions, causing the soft rot of tomato, pear, peach, pitahaya, jambolan (Ginting *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2014) and recently, it was reported to have infected papaya fruits in the state of Colima, Mexico (Cruz-Lachica *et al.*, 2016). This study reports the presence of this species in the states of Oaxaca and Veracruz, showing that it is present in other papaya producing regions and its distribution should be considered important.

The morphological characteristics of *R. oryzae* correspond with those reported by diverse authors, and its identity was confirmed by phylogenetic analysis. *R. oryzae* has been reported to cause soft rot in banana and citron (Kwon *et al.*, 2012; Hakim *et al.*, 2015), and therefore this work is the first report affecting papaya in Mexico.

dos morfotipos, los cuales se han definido por Lacap et al. (2003) como cepas de una misma especie que presentan diferencias en morfología colonial y tasa de desarrollo micelial, lo cual se corroboró con la separación en clados dentro de los dendogramas tanto de la región ITS como 28S (Figuras 5 y 6). El morfotipo 1 (colonias petaladas, esporangios café) se observó en el 31% de los aislamientos; mientras que el resto de aislamientos mostró el morfotipo 2 (69%). *G. persicaria* es un patógeno común en regiones tropicales y subtropicales causando la pudrición blanda de tomate, pera, durazno, pitahaya, jambolán (Ginting et al., 1996; Guo et al., 2012; Pinho et al., 2014) y recientemente, se reportó causando enfermedad en frutos de papaya en el estado de Colima, México (Cruz-Lachica et al., 2016); en este estudio se reporta la presencia de esta especie en los estados de Oaxaca y Veracruz con lo que se demuestra que está presente en otras regiones de producción de papaya y debería considerarse su distribución como un factor de importancia.

Las características morfológicas de *R. oryzae*, concuerdan con las reportadas por diversos autores y su identidad se confirmó mediante el análisis filogenético. *R. oryzae* se ha reportado causando pudrición blanda en banana y cidra (Kwon et al., 2012; Hakim et al., 2015), por lo que se considera a este trabajo como el primer reporte afectando papaya en México.

De acuerdo con el origen de las muestras analizadas, *M. irregularis* fue detectado en el estado de Veracruz, *R. oryzae* en el estado de Colima y *G. persicaria* en Colima, Oaxaca y Veracruz. En México, *Mucor hiemalis* y *M. circinelloides* se han descrito afectando papaya en Veracruz (Suárez-Quiroz et al., 2013); sin embargo, la identificación de especies en ese estudio sólo involucró características morfológicas, por lo que se recomienda realizar análisis moleculares debido a lo siguiente:

According to the origin of the samples analyzed, *M. irregularis* was found in the state of Veracruz, *R. oryzae* in the state of Colima, and *G. persicaria* in Colima, Oaxaca, and Veracruz. In Mexico, *Mucor hiemalis* and *M. circinelloides* have been described as affecting papaya in Veracruz (Suárez-Quiroz et al., 2013). However, the identification of species in this study only involved morphological characteristics, therefore performing molecular analyses is recommendable for the following reasons: *M. hiemalis* and *M. irregularis* are found in a group of widely related species that require the use of molecular analyses in at least two regions of the genome for their identification (Walther et al., 2013). In the case of *M. circinelloides*, the identification based on symptoms in fruit and characteristics of sporangia corresponds with results obtained for *G. persicaria*, therefore distinctive characteristics of the latter species such as the opening of the sporangial wall in two halves and hyalin appendages in sporangiospores can go unnoticed.

CONCLUSIONS

This study showed that *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis*, and *Rhizopus oryzae* are causal agents of soft rot in papaya fruits. This is the first report on *Mucor irregularis* and *Rhizopus oryzae* affecting this crop in Mexico, and it shows that *G. persicaria* affects fruits in orchards in all three states. Finally, this study shows that the phenotypic and genotypic characterization is, in combination, an adequate strategy to identify species, particularly those that belong to widely related taxons. The access numbers for *M. irregularis* and *R. oryzae* in the NCBI genbank were KR076763 and KR076764, and KT899481 and KT899482, respectively.

M. hiemalis y *M. irregularis* se encuentran en un grupo de especies estrechamente relacionadas que requieren del uso de análisis moleculares en al menos dos regiones del genoma para su identificación (Walther *et al.*, 2013); en el caso de *M. circinelloides*, la identificación en base a síntomas en fruto y características de esporangios concuerda con lo obtenido para *G. persicaria*, por lo que características distintivas de esta última especie como apertura de pared esporangial en dos mitades y apéndices hialinos en esporangiosporas pueden pasar desapercibidas.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis* y *Rhizopus oryzae* son agentes causales de pudrición blanda en frutos de papaya. Éste es el primer reporte de *Mucor irregularis* y de *Rhizopus oryzae* afectando este cultivo en México y además demuestra que *G. persicaria* se encuentra afectando frutos en huertos de los tres estados. Finalmente, este estudio evidencia que la caracterización fenotípica y genotípica en conjunto es una estrategia adecuada para identificar especies, en particular las que pertenecen a taxones estrechamente relacionados. Los números de acceso de *M. irregularis* y *R. oryzae* en el genbank NCBI fueron KR076763 y KR076764, y KT899481 y KT899482, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” de SAGARPA por el financiamiento para esta investigación. A CONACyT por el apoyo financiero a los estudios de I. Cruz-Lachica.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the project 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” (The comprehensive management of papaya crops in Mexico, an innovative approach) by SAGARPA for the funding for this research. To CONACyT for the financial support of I. Cruz-Lachica’s studies.

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

## LITERATURA CITADA

- Alves MH, Campos-Takaki GM, Figueiredo PAL and Milanez AI. 2002. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. Brazilian Journal of Microbiology 33:325-330. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400009>.
- Beales P. 2012. Detection of fungal plant pathogens from plants, soil, water and air. Pp: 26-52. In: Lane RC, Bealesand PA and Hughes JDK (eds.). Fungal Plant Pathogens. CAB International. U. K. 324 p.
- Benny L. 1991. *Gilbertellaceae*, a new family of the *Mucorales* (Zygomycetes). Mycologia 83:150-157. <http://dx.doi.org/10.2307/3759930>.
- Campbell CK, Johnson EM and Warnack DW. 2013. Identification of Pathogenic Fungi. Second Edition. Wiley-Blackwell. Health Protection Agency. U.K. 337 p.
- Chukwuka KS, Okonko IO and Adekunle AA. 2010. Microbial ecology of organisms causing pawpaw (*Carica papaya* L.) fruit decay in Oyo State, Nigeria. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences 2:43-50. [http://www.idosi.org/aejts/2\(1\)10/7.pdf](http://www.idosi.org/aejts/2(1)10/7.pdf).
- Cruz-Lachica I, Marquez-Zequera I, Garcia-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, Leon-Felix J and Allende-Molar R. 2016. First report of *Gilbertella persicaria* causing papaya fruit rot. Plant Disease 100:227. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0607-PDN>.
- de Hoog GS and van den Ende GAH. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. Mycoses 41:183-189. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00321.x>.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791. <http://dx.doi.org/10.2307/2408678>.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2014. Estadísticas. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consulta (Julio, 2016).
- Ginting C, Zehr EI and Westcott SW. 1996. Inoculum source and characterization of isolates of *Gilbertella persicaria* from peach fruit in South Carolina. Plant Disease 80:1129-



1134. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n10\\_1129.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n10_1129.pdf).
- Guo LW, Wu XY, Mao ZC, Ho HH and He YQ. 2012. Storage rot of dragon fruit caused by *Gilbertella persicaria*. Plant Disease 96(12):1826. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0635-PDN>.
- Hakim S, Naz S, Gul S, Chaudhary HJ and Munis MFH. 2015. First report of *Rhizopus oryzae* causing fruit rot of *Citrus medica* L. in Pakistan. Journal of Plant Pathology 97:209-220. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I1.035>.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic acids. Symposium Series. Oxford University Press 41:95-98. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, Hoog GS, Benny GL, Kirk PM and Voigt K. 2013. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. Persoonia 30:57-76. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X666259>.
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE et al. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). Fungal Diversity 67:21-125. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>.
- Krisch J, Takó M, Papp T and Vágvölgyi C. 2010. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from Zygomycetes. Pp: 891-895. In: Méndez-Vilas A (ed.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Vol. II. Formatex Research Center. Extremadura, Spain. 1620 p.
- Kwon J, Ryu J, Chi TTP, Shen S and Choi O. 2012. Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. Mycobiology 40:214-216. <http://dx.doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.2.140>.
- Lacap DC, Hyde KD and Liew ECY. 2003. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. Fungal Diversity 12: 53-66. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD12-53-66.pdf>.
- Michailides TJ. 1991. Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. Plant Disease 75:373-380. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n04\\_373.pdf](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n04_373.pdf).
- Michailides TJ and Spotts RA. 1990. Postharvest diseases of pome and stone fruits caused by *Mucor piriformis* in the Pacific Northwest and California. Plant Disease 74:537-543. [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n08\\_537.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n08_537.PDF).
- Morton J. 1987. Papaya (*Carica papaya* L.). Pp: 336-346. In: Morton JF (ed.). Fruits of warm climates. Creative Resource Systems Inc. Winterville, USA. 505 p.
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. Pp: 225-233. In: Reynolds DR and Taylor JW (eds.). The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International. Wallingford. UK. 375 p.
- Papp T, Vastag M, Michailides TJ, Ferenczy L and Vágvölgyi C. 2001. Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (-) mating types. Antonie Van Leeuwenhoek 80:301-309. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013066024258>.
- Peng XD, Huang SL and Lin SH. 2015. First report of corn kernel brown spot disease caused by *Mucor irregularis* in China. Plant Disease 99:159-160. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0814-PDN>.
- Pinho DB, Pereira OL and Soares DJ. 2014. First report of *Gilbertella persicaria* as the cause of soft rot of fruit of *Syzygium cumini*. Australasian Plant Disease Notes 9:143-146. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-014-0143-0>.
- Ryan M, Ritchie BJ and Smith D. 2012. Maintenance and storage of fungal plant pathogens. Pp: 223-250. In: Lane CR, Beales PA and Hughes KJD. Fungal Plant Pathogens. CAB International. South Asia. 324 p.
- Suárez-Quiroz ML, Mendoza-Bautista I, Monroy-Rivera JA, de la Cruz-Medina J, Angulo-Guerrero O y González-Ríos O. 2013. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (*Carica papaya* L.). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 14:115-124. <http://www.redalyc.org/pdf/813/81329290004.pdf>.
- Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/10/3/512.long>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis Versión 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Vilgalys R and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 172:4238-4246. <http://jb.asm.org/content/172/8/4238.long>.
- Voigt K, Cigelnik E and O'Donnell K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. Journal of Clinical Microbiology 37(12):3957-3964. <http://jcm.asm.org/content/37/12/3957.long>.
- Walther G, Pawłowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodríguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A and de Hoog GS. 2013. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. Persoonia 30:11-47. <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X665070>.
- White T, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. Pp: 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (Eds.). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego. Academic Press. 392 p. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>.