

Caracterización Molecular y de Ensayos de Patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal de la Antracnosis del Limón en Texas

Molecular Characterization and Pathogenicity Assays of *Colletotrichum acutatum*, Causal Agent for Lime Anthracnose in Texas

Amy Ruiz, South Texas College, 400 N. Border, Weslaco, Texas 78596; **Cynthia C. Parra**, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA; **John V. da Graça**, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA; **Bacilio Salas**, USDAAPHIS-PPQ-CPHST, 22675 N Moorefield Rd, Edinburg, TX 78541; **Nasir S. A. Malik**, USDA-ARS, ERRC, 600 E Mermaid Lane, Wyndmoor, PA 19038; **Madhurababu Kunta**, Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 312 N. International Blvd. Weslaco, TX 78599, USA. Correspondence: madhura.kunta@tamuk.edu

(Recibido: Junio 12, 2014 Aceptado: Noviembre 05, 2014)

Ruiz A, Parra CC, da Graça JV, Salas B, Malik NSA y Kunta M. 2014. Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 52-61.

Resumen. Varias muestras de fruto, hojas y ramas de limón mexicano [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] afectadas con síntomas típicos de antracnosis del limón fueron recolectadas de tres árboles en zonas residenciales de Brownsville, Texas. El hongo causante de la antracnosis, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds fue aislado de las muestras de hoja y de fruto. La amplificación de la región de repetición del ADN ribosomal del núcleo usando primers ITS1 y ITS4 y intron 2 del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa usando GDF y GDR del ADN del hongo resultó en amplicones de aproximadamente 520 pb y 260 pb, respectivamente. La búsqueda de similitud entre las secuencias de nucleótidos obtenidos de los fragmentos de 520 pb y 260 pb con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mostró un grado de identidad del 99% con *C. acutatum* y del 100% con varias especies de *Colletotrichum*, respectivamente. Los aislamientos del hongo fueron confirmados como de *C. acutatum* por amplificación selectiva de un fragmento de PCR de unas 490 bp usando el primer especie específico *CaInt2* en combinación con el primer ITS4. El árbol filogenético que fue construido usando los datos de la secuencia del nucleótido ITS separó los aislados de postbloom fruit drop (PFD) y los colocó en el grupo de aislados de key lime anthracnose (KLA). Los ensayos de patogenicidad por inoculación de muestras de hojas, flor, y fruto mostraron que tanto el limón mexicano sin espinas como el limón mexicano común mostraron síntomas típicos

Abstract. Several distorted Mexican lime [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] fruit, leaf, and twig samples with lime anthracnose symptoms were collected from three trees in residential areas of Brownsville, Texas. The causal fungal organism, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds was isolated from leaves and fruit. Amplification of nuclear ribosomal DNA repeat region using ITS1 and ITS4 primers and intron 2 of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene using GDF and GDR from fungal DNA resulted in approximately 520 bp and 260 bp amplicons, respectively. Similarity search for the nucleotide sequences obtained from 520 bp and 260 bp fragments at Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) program showed 99% identity to *C. acutatum* and 100% identity to several *Colletotrichum* species, respectively. The fungal isolates were further confirmed as *C. acutatum* by selective amplification of about 490 bp PCR fragment using species specific primer *CaInt2* in combination with primer ITS4. Phylogenetic tree constructed using ITS nucleotide sequence data separated the isolate from the postbloom fruit drop (PFD) isolates and placed it in the group of key lime anthracnose (KLA) isolates. Pathogenicity assays by inoculation of detached leaves, flowers, and fruit showed that thornless Mexican lime and common Mexican lime showed typical symptoms of KLA while inoculated detached leaves of Rio Red grapefruit, Valencia sweet orange, Bearss lime, pink Eureka lemon, Eustis limequat, Ponderosa lemon, kaffir lime, seedless Lisbon lemon, and Meyer lemon did not develop any lesions.

Additional keywords. Key lime, anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, citrus.

Mexican, West Indian, or Key lime [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] is an important crop primarily used for its flavor in food and beverages. It is native to the Indo-

de key lime anthracnose (KLA), mientras que hojas inoculadas del toronjo Rio Red, el Naranja dulce Valencia, el limón Bearss, el limón pink Eureka, el limequat Eustis, el limón Ponderosa, la lima kaffir, el limón sin semilla Lisbon, y el limón Meyer no desarrollaron ninguna lesión.

Palabras clave adicionales. Lima, antracnosis, *Colletotrichum acutatum*, cítricos.

El limón mexicano, de las Indias Occidentales o limón [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] es un cultivo importante que se utiliza principalmente por su sabor en bebidas y alimentos. Es nativo de la región Indomalaya (Morton, 1987) y las principales regiones productoras de este cultivo incluyen México, la India, las Indias Occidentales y los Cayos de Florida (2). En los EE.UU. el consumo de limones (persas, Tahití, Bearss y mexicano) ha ido aumentando de manera constante y valor de las importaciones fue de alrededor de \$183 millones en 2012, en gran parte proveniente de México (Boriss y Huntrods, 2013).

La antracnosis del limón (KLA) causada por el hongo patógeno *Colletotrichum acutatum* Simmonds JH (*Gloeosporium limeticolum* Clausen) (Teleomorfo: *Glomerella acutata* Guerber y JC Correll), es un problema devastador en el limón mexicano. Esta enfermedad se reportó por primera vez en California en 1912 (Clausen, 1912) y más tarde se encontró en Florida y las Indias occidentales (Antillas y Bahamas) (Fawcett, 1936; Knorr *et al.*, 1957). Knorr *et al.* (1957) descubrieron que la enfermedad sólo afecta al limón mexicano y al dominicano sin espinas y no afecta a otras variedades de limones como la Tahití (= Bearss y persas). Además, de que para la patogénesis del *C. acutatum* en cítricos, es necesario un gen que codifique al regulador de la transcripción del pH putativo (You *et al.*, 2007).

El hongo es conocido por atacar a las hojas jóvenes, ramillas, frutos inmaduros y los botones (Burnett, 1972). Los botones florales infectados se tornan marrones y caen antes de abrir, los frutos jóvenes inmaduros infectados desarrollan lesiones que conducen a frutos deformes y caen antes de tiempo. Los frutos infectados en etapa tardía presentan lesiones grandes y hundidas además de reducción del tamaño del fruto (Knorr *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 2005). Esta enfermedad es un problema serio para la producción de limón mexicano en México, Florida y el área del Caribe (Fawcett, 1936). En Texas, la enfermedad se reportó en el verano de 1976 en arboles de limón mexicano que crecían en el Citrus Center de la Universidad de Texas A & I [ahora conocido como el Kingsville Citrus Center de la Universidad de Texas A&M (TAMU-KCC)] en Weslaco, causando graves destrozos en los nuevos brotes así como la caída prematura de flores y frutos jóvenes (Timmer, 1978).

La caída prematura de frutos post- floración (PFD) se reportó por primera vez en Belice en 1979 (Denham, 1979). Ahora se sabe que el *C. acutatum* JH Simmonds también causa la enfermedad PFD en naranjas dulces, limas y limones, con algunos brotes graves en Florida y Brasil. Sin embargo, es importante señalar que los aislamientos PFD

Maialayan region (Morton, 1987) and major producing regions of this crop include Mexico, India, West Indies and Florida Keys (2). In the US, consumption of limes (Persian, Tahiti, Bearss, and Mexican) has been steadily increasing and import value was around \$183 million in 2012, largely from Mexico (Boriss and Huntrods, 2013).

Key lime anthracnose (KLA) caused by the fungal pathogen, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (*Gloeosporium limeticolum* Clausen) (Teleomorph: *Glomerella acutata* Guerber & J.C. Correll), is a devastating problem in Mexican lime. The disease was first reported from California in 1912 (Clausen, 1912) and later it was found in Florida and West Indies (Fawcett, 1936; Knorr *et al.*, 1957). Knorr *et al.* (1957) found that the disease affects only Mexican limes and Dominican thornless lime and does not affect other limes such as Tahiti lime (=Bearss and Persian). Additionally, gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is essential for *C. acutatum* pathogenesis on citrus (You *et al.*, 2007).

The fungus is known to attack young leaves, twigs, immature fruits, and blooms (Burnett, 1972). Infected flower buds turn brown and fall before opening, infected young immature fruit will develop lesions leading to misshapen fruits and drop prematurely. Late infected fruit show large and sunken canker lesions with fruit size reduction (Knorr *et al.*, 1957; Chen *et al.*, 2005). This disease is a serious problem for Mexican lime production in Mexico, Florida, and the Caribbean area (Fawcett, 1936). In Texas, the disease was reported in summer 1976 on Mexican lime trees growing at Texas A&I University Citrus Center [now Texas A&M University Kingsville Citrus Center (TAMU-KCC)] in Weslaco, causing severe blight of new flush, premature dropping of flowers and young fruit (Timmer, 1978).

Postbloom fruit drop (PFD) was first reported in Belize in 1979 (Denham, 1979). *C. acutatum* J. H. Simmonds is also known to cause PFD disease in sweet oranges, limes, and lemons, with some severe outbreaks in Florida and Brazil. However, it is important to note that PFD isolates from affected citrus did not cause KLA while KLA isolates caused less PFD compared to PFD isolates from affected sweet orange (Agostini *et al.*, 1992). It was reported that PFD and KLA strains might have independently dispersed throughout Americas in association with each host (Peres *et al.*, 2008).

The disease is serious only when new flushes coincide with extended periods of rainfall. Frequent copper fungicide application during flushes can effectively control the disease (Timmer, 1978). Also, Benomyl (Benlate 50WP), was shown to be effective in controlling both KLA and PFD (Peres *et al.*, 2004) and benomyl and captafol to control PFD (Denham, 1979).

Mexican lime is grown only for ornamental purposes and for home use, but, at least at present time, it is not grown commercially in the Lower Rio Grande Valley (LRGV), thus KLA is not a direct threat to commercial citrus in LRGV. However, it is important to study the disease, identify and characterize the fungal pathogen as the trees infected by KLA can become source of pathogen spread to

de los cítricos afectados no causaron KLA, mientras que los aislamientos KLA causaron menos PFD en comparación con los aislamientos PFD de naranja dulce afectada (Agostini *et al.*, 1992). Se planteó que las cepas de PFD y del KLA podrían haberse dispersado de forma independiente a lo largo de América en asociación con cada hospedero (Peres *et al.*, 2008).

La enfermedad es grave únicamente cuando los nuevos brotes coinciden con períodos prolongados de lluvias. La aplicación frecuente de fungicidas de cobre durante la etapa de brotación puede controlar eficazmente la enfermedad (Timmer, 1978). Además, el benomilo (Benlate 50WP) ha demostrado ser eficaz en el control tanto de KLA como de PFD (Peres *et al.*, 2004) y el benomilo y captafol para controlar PFD (Denham, 1979).

El limón mexicano sólo se cultiva con fines ornamentales y de uso en el hogar, pero, al menos en la actualidad, no se cultiva comercialmente en el Valle Bajo del Río Grande (LRGV), así que el KLA no es una amenaza directa para los cítricos comerciales en LRGV. Sin embargo, es importante para estudiar la enfermedad, identificar y caracterizar el patógeno fúngico ya que los árboles infectados por KLA pueden convertirse en una fuente de propagación del patógeno hacia futuras nuevas áreas de producción de limón comercial.

Los principales objetivos de este estudio fueron identificar al *C. acutatum* causante del KLA en el limón mexicano de Texas, utilizando herramientas moleculares así como determinar la patogenicidad de los aislados *C. acutatum* en diferentes plantaciones de cítricos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Material vegetal y Aislamiento fúngico. Las hojas sintomáticas de KLA, ramillas y frutos fueron recolectados durante la última semana de septiembre de 2012 por personal del USDA APHIS y del TAMUKCC de tres árboles diferentes de limón mexicano en un área residencial de Brownsville- TX. Los tejidos afectados de hojas jóvenes y frutos inmaduros se limpiaron en agua corriente durante 10 min, se esterilizó la superficie con etanol al 70% durante 30 s, hipoclorito de sodio al 0.05% durante 1 min, y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (SDW). Pequeños trozos de tejido se colocaron en placas de agar de agua, y se incubaron a 26°C durante 48 h. Los bordes de crecimiento de hifas fúngicas emergentes a partir de piezas de tejido se transfirieron asépticamente a agar de papa dextrosa (PDA), se cultivaron a 26°C, y los cultivos de hongos fueron identificados por sus características y la morfología de sus conidios (Sutton, 1980).

Aislamiento del ADN y PCR. Se aisló el ADN total utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de cualquier tejido lesionado de las hojas o el fruto o directamente del micelio del hongo crecido durante tres días en Difco™ Papa Dextrosa Agar (PDA) a 26°C. El tejido fue colocado en un tubo de 2 ml con el lisado de la matriz A (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) con tampón de extracción y se pulverizó durante 3 min usando un Mini-BeadBeater-96 (Biospec Products Inc, Bartlesville, OK). El extracto de ADN total se eluyó en 100 µL de agua libre de nucleasa. Un

future new commercial lime production areas.

The main objectives of this study are to identify *C. acutatum* causing KLA in Texas Mexican lime using molecular tools and determine pathogenicity for the isolated *C. acutatum* on different citrus cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Fungal Isolation. KLA symptomatic leaves, twigs, and fruit were collected during last week of September, 2012 by USDA APHIS and TAMUKCC personnel from three different Mexican lime trees in the residential locations in Brownsville-TX. The affected tissues from young leaves and immature fruit were cleaned in running tap water for 10 min, surface sterilized in 70% ethanol for 30 s, 0.05% sodium hypochlorite for 1 min, and rinsed 3 times in sterile distilled water (SDW). Small tissue pieces were placed on water agar plates, and incubated at 26°C for 48 h. The growing edges of fungal hyphae emerging from tissue pieces were aseptically transferred to potato dextrose agar (PDA), grown at 26°C, and fungal cultures were identified by cultural characteristics and conidial morphology (Sutton, 1980).

DNA Isolation and PCR. Total DNA was isolated using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) from either lesion tissue on the leaves and fruit or directly from the fungal mycelium grown for three days on Difco™ Potato Dextrose Agar (PDA) at 26°C. The tissue was placed in a 2 mL lysing matrix A tube (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) with extraction buffer and pulverized for 3 min using a Mini-Beadbeater-96 (Biospec Products Inc, Bartlesville, OK). The extract of total DNA was eluted in 100 µL nuclease-free water. A total of 6 DNA extracts including 3 from infected tissue and 3 from fungal isolates were used in PCR and obtaining nucleotide sequence information. The nuclear ribosomal DNA repeat region and genes encoding portions of small and large subunit rRNA was amplified using ITS1 and ITS4 primers (White *et al.*, 1990). Intron 2 of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3PD*) gene was amplified using GDF and GDR primers (Guerber *et al.*, 2003). Species identification of *C. acutatum* was performed by selective amplification of part of ITS-5.8S rDNA region using specific primer *CaInt2* in combination with primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). The PCR amplification products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, ethidium-bromide stained, visualized under UV light, and photographed using Biospectrum imaging system (UVP, Upland, CA). Thin slices of agarose gel containing the amplicon DNA were cut; DNA was purified using Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and sequenced at MCLAB (MCLAB, San Francisco, CA). The nucleotide sequences were analyzed for similarities at National Center for Biotechnology Information's (NCBI) database using Blastn program and deposited into GenBank. The ITS nucleotide sequence together with published sequences in the GenBank were aligned with ClustalW using MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). The evolutionary history was inferred using Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980) and

total de 6 extractos de ADN, incluyendo 3 de tejido infectado y 3 de aislados fúngicos, se analizaron por PCR y se obtuvo la información de la secuencia de nucleótidos. La región de repetición del ADN ribosomal nuclear y los genes que codificaban porciones de la subunidad pequeña y grande del rRNA se amplificaron utilizando los primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). El intrón 2 del gen de la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (G3PD) se amplificó usando GDF y los primers GDR (Guerber *et al.*, 2003). La identificación de especies de *C. acutatum* se realizó mediante amplificación selectiva de una parte de la región del rDNA ITS-5.8S utilizando el primer específico *CaInt2* en combinación con el primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996). Los productos de amplificación de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, se visualizaron bajo luz UV y se fotografiaron usando el sistema de imágenes BioSpectrum (UVP, Upland, CA). Se cortaron rebanadas finas de gel de agarosa que contenían el amplicon de ADN; el ADN se purificó usando el Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), y se secuenció en MCLAB (MCLAB, San Francisco, CA). Se analizaron las secuencias de nucleótidos para encontrar similitudes en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI), utilizando el software Blastn y se depositaron en el GenBank. La secuencia de nucleótidos ITS junto con las secuencias publicadas en el GenBank fueron alineados con ClustalW utilizando MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de "Neighbor-Joining" (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2-parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y el árbol filogenético se construyó usando el MEGA6. El árbol filogenético se evaluó con 1000 repeticiones de arranque para poner a prueba la estabilidad del clado.

Ensayos de patogenicidad. Se obtuvieron un total de 14 hojas inmaduras jóvenes por cada plantío de limón mexicano [*C. aurantiifolia* (Christm. Swingle), toronja Río Red (*C. paradisi* Macfad.), naranja dulce Valencia (*C. sinensis* L. Osbeck), limón Bearss (*C. latifolia* Tanaka), limón rosa Eureka (*C. limon* L. Burm.f.), limequat Eustis [*C. floridana* (J. Ingram & H. Moore) Mabb.], limón Ponderosa (*C. limon* L. Burm.f.), lima kaffir (*C. hystrix*), limón Lisboa sin semillas (*C. limon* L. Burm.f.) y limón Meyer (*C. limon* L. Burm.f.). Se tuvo cuidado de reducir al mínimo los posibles daños físicos a las hojas mientras se realizaba la recolección. Los conidios de cultivos de hongos de 7-10 d de edad en placas de PDA se lavaron en 2 mL de SDW, se pasaron a través de tela de malla de queso, se diluyeron en SDW y la suspensión de esporas se ajustó a 10^6 conidios por mL. Se inocularon las hojas en papel filtro húmedo en cajas Petri mediante la colocación de 6 gotas de 20 μ L de suspensión de esporas con 3 gotas en cada lado de la nervadura de la hoja, y se incubaron a 26°C. Adicionalmente, se inocularon flores desprendidas de limonero mexicano sin espinas así como flores y fruto desprendidas de limonero mexicano común, usando 20 μ L de suspensión de esporas y se incubaron a 26°C. Las hojas, flores y frutos se observaron para buscar cualquier lesión

the phylogenetic tree was constructed using MEGA6. The phylogenetic tree was evaluated with 1000 bootstrap replicates to test the clade stability.

Pathogenicity Assays. A total of 14 young immature leaves per cultivar were collected from Mexican lime [*C. aurantiifolia* (Christm. Swingle), Rio Red grapefruit (*C. paradisi* Macfad.), Valencia sweet orange (*C. sinensis* L. Osbeck), Bearss lime (*C. latifolia* Tanaka), pink Eureka lemon (*C. limon* L. Burm.f.), [*C. floridana* to (Limequat X Citrofortunella floridiana) (J. Ingram&H. Moore) Mabb.], Ponderosa lemon (*C. limon* L. Burm.f.), kaffir lime (*C. hystrix*), seedless Lisbon lemon (*C. limon* L. Burm.f.), and Meyer lemon ©. *X limon* L. Burm.f.). Care was taken to minimize physical damage to the leaves while collection. Conidia were washed into 2 mL SDW from 7-10 d old fungal cultures on PDA plates, passed through cheese cloth, diluted in SDW, and the spore suspension was adjusted to 10^6 conidia per mL. Leaves on moist filter paper in Petri dishes were inoculated by placing 6 droplets of 20 μ L spore suspension with 3 droplets on each side of the leaf midrib, and incubated at 26°C. Additionally, detached flowers of thornless Mexican lime and detached flowers and fruit of common Mexican lime were inoculated using 20 μ L spore suspension and incubated at 26°C. Leaves, flowers, and fruit were observed for any necrotic lesions 6 d post inoculations.

RESULTS

Typical KLA symptoms on Mexican lime. All three Mexican lime trees that were affected by KLA showed typical leaf symptoms of circular to oval brown spots, shot hole appearance in mature leaves where center of leaf spot fell out and twigs with severe blight, wilt, and die back (Figure 1 A-C). The flower buds were brown and often fall before opening leaving persistent calyxes (Figure 1 D-E) and fruit showed shallow necrotic lesions to large brown depressed cankers (Figure 1 F-G). Several infected immature fruits developed brown lesions, misshapen, and dropped prematurely.

PCR and DNA sequencing. PCR using GDF/GDR and ITS1/ITS4 primers on DNA extracts from either lesion tissue from KLA affected leaves and fruit or from the fungal mycelia resulted in amplification of approximately 260 bp and 520 bp fragments, respectively (Figure 2). Nucleotide sequences were obtained for the PCR fragments produced from amplification of fungal culture DNA extracts. Similarity searches for amplicons at Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) program showed 100% identity (E value $2e-132$) to several *Colletotrichum* species [*Colletotrichum* sp. NBL-2013 culture collection CMM:4093 (Accession: KC517164), CMM:4094 (KC517155), CMM:4096 (KC517190), CMM:4097 (KC517189)] and 99% identity (E value 0.0) to *C. acutatum*, respectively. For example, homology search for ITS based nucleotide sequence of 520 bp showed 99% homology to *Glomerella acutata* strain UCA1121 (GeneBank Accession: EF622192), *G. acutata* strain UCA1109 (Accession: EF622187), and *G. acutata* (Accession: FN566877, EU008878). Alignment of this sequence with nucleotide sequence available for *C. acutatum* (Type strain IMI117617,

necrótica 6 d después de las inoculaciones.

RESULTADOS

Síntomas típicos del KLA en limón mexicano. Los tres árboles de limón mexicano que fueron afectados por KLA, mostraron los síntomas foliares típicos como son las manchas marrones de circulares a ovaladas, apariencia de un agujero de disparo en las hojas maduras y ramillas con plaga severa, marchitamiento, y muerte (Figura 1 A-C). Los botones de las flores eran marrones y a menudo cayeron antes de abrir dejando cálices persistentes (Figura 1 D-E) y los frutos mostraron lesiones necróticas superficiales hasta grandes fisuras marrones (Figura 1 F-G). Varios frutos inmaduros infectados desarrollaron lesiones marrones, deformes, y cayeron prematuramente.

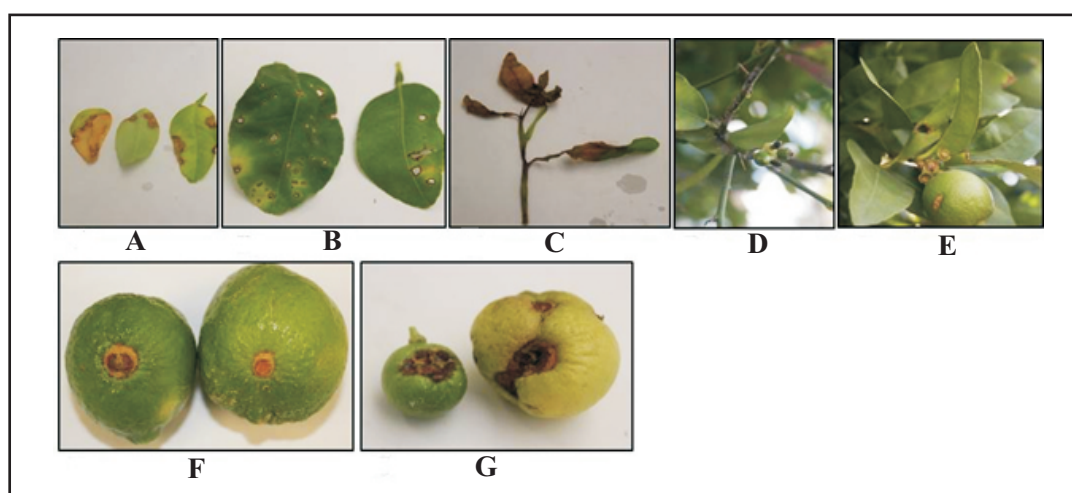


Figura 1. Síntomas de la enfermedad de la antracnosis del limón (KLA) en Texas. Hoja de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] que muestra necrosis (A), orificios en la hoja madura (B), tizón en las ramillas y muerte progresiva (C), capullos marrones (D), caída prematura de la fruta y cálices persistentes (E) y frutos que presentan lesiones necróticas superficiales (F), fruta deforme con grandes canales necróticos profundos y deprimidos (G).

Figure 1. Lime anthracnose (KLA) disease symptoms in Texas. Mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] leaf showing necrosis (A), shot holes on mature leaf (B), twig blight and dieback (C), brown flowerbuds (D), premature fruit drop and persistent calyxes (E), and fruit showing shallow necrotic spot lesions (F), misshapen fruit with large deep and depressed necrotic cankers (G).

PCR y secuenciación del ADN. Los estudios realizados por PCR usando los primers GDF/GDR y ITS1/ITS4 en extractos de ADN de cualquier tejido lesionado de hojas y frutos afectados por el KLA, o de los micelios fúngicos dieron como resultado la amplificación de fragmentos de aproximadamente 260 pb y 520 pb, respectivamente (Figura 2). Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron para los fragmentos de PCR producidos a partir de la amplificación de extractos de ADN del cultivo de hongos. Las búsquedas de similitudes para los amplicones con el software Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) mostro un 100% de identidad (valor de $E=2e^{-132}$) con varias especies de *Colletotrichum* [*Colletotrichum* sp. NBL-2013 colección de cultivos CMM: 4093 (Acceso: KC517164), CMM: 4094 (KC517155), CMM: 4096 (KC517190), CMM: 4097 (KC517189)] y el 99% de identidad (valor de $E=0.0$) a *C. acutatum*, respectivamente.

Accession: AF411700) (Hyde et al., 2009) using BLASTn Align sequences showed 99% identities. Nucleotide sequences were deposited in NCBI's GenBank database (accession numbers: KJ872586 and KJ872587). PCR amplification using *C. acutatum* species specific primer *CaInt2* and primer ITS4 resulted in amplification product of size 490 bp (Figure 3). The PFD isolates and KLA isolates formed distinct clades in the phylogenetic tree (Figure 4) and Texas KLA isolate occurred on the same clade with other KLA isolates that were used in the analysis. The KLA, PFD, and the isolate from blueberry (EU168904) grouped into three distinct clades while the isolate from *Rhododendron* spp. (AF411700) formed into a separate clade from the group of PFD isolates.

Fungal Isolates and Pathogenicity Studies. A total

of 18 fungal isolates were obtained including 9 from each of tissue of KLA affected leaf and fruit samples. The fungal colonies were slow growing and conidia were ellipsoid and fusiform at one end. All the isolates were highly pathogenic only to thornless Mexican lime and common Mexican lime leaves, immature fruits, and flowers. Severe necrotic lesions were present at 6 d post inoculation (Figure 5 A-E). Inoculation of detached leaves of Rio Red grapefruit, Valencia sweet orange, Bearss lime, pink Eureka lemon, Eustis limequat, Ponderosa lemon, kaffir lime, seedless Lisbon lemon, and Meyer lemon did not show any necrotic lesions (Figure 5 F-N).

DISCUSSION

KLA disease in Texas caused by *Gloeosporium limeticolum* Clausen (Clausen, 1912) in Mexican lime was reported by Timmer (1978). The pathogen name was revised

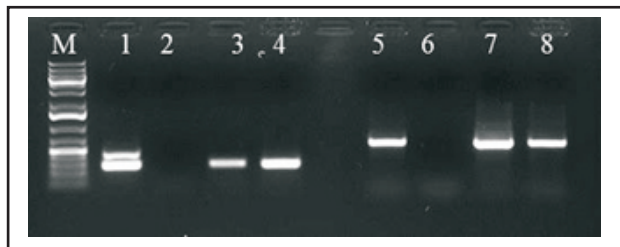


Figura 2. Gel de agarosa que muestra fragmentos de PCR producidos por la amplificación de aislado de KLA de los extractos de ADN de hongos utilizando los primers GDF/GDR (1, 3, 4) y ITS1/ITS4 (5, 7, 8). Control no templado (2 y 6). M = 1 kb más marcadores moleculares (Fermentas).

Figure 2. Agarose gel showing PCR fragments produced by amplification on KLA isolate fungal DNA extracts using GDF/GDR primers (1, 3, 4) and ITS1/ITS4 primers (5, 7, 8). Non-template control (2 and 6). M= 1 kb plus Molecular marker (Fermentas).

Por ejemplo, la búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos ITS de 520 pb mostró un 99% de homología con la *G. acutata* cepa UCA1109 (Acceso: EF622187), y *G. acutata* (Acceso: FN566877, EU008878). La alineación de esta secuencia con la secuencia de nucleótidos disponibles para *C. acutatum* (Tipo de cepa IMI117617, Acceso: AF411700) (Hyde *et al.*, 2009) utilizando secuencias BLASTn Align mostraron un 99% de identidad. Las secuencias de nucleótidos fueron depositados en la base de datos del GenBank NCBI (números de acceso: KJ872586 y KJ872587). La amplificación por PCR utilizando especies de *C. acutatum* con el primer específico *CaInt2* y el primer ITS4 dio como resultado un producto de amplificación de 490 pb (Figura 3). Los aislamientos del PFD y del KLA formaron clados distintos en el árbol filogenético (Figura 4) y el aislamiento del KLA de Texas apareció en el mismo clado con otros aislados de KLA que fueron utilizados en el análisis. El KLA, PFD, y el aislado de arándano (EU168904) se agruparon en tres clados diferentes mientras que el aislado de *Rhododendron* spp. (AF411700) se formó en un clado separado del grupo de aislamientos del PFD.

Aislados fúngicos y Estudios de patogenicidad. Se obtuvieron un total de 18 aislados fúngicos incluyendo 9 de cada uno de los tejidos de muestras afectadas por KLA tanto de hojas como de frutos. Las colonias de hongos fueron de lento crecimiento y los conidios fueron elipsoidales y fusiforme en un extremo. Todos los aislamientos fueron altamente patógenos únicamente en las hojas, frutos inmaduros y flores del limonero mexicano sin espinas y del limonero mexicano común. Las lesiones necróticas graves se presentaron 6 días después de la inoculación (Figura 5 A-E). La inoculación de hojas desprendidas de toronja Río Red, naranja dulce Valencia, limón Bearss, limón rosa Eureka, limequat Eustis, limón Ponderosa, lima kaffir, sin semillas Lisboa limón y limón Meyer no mostró lesiones necróticas (Figura 5 F-N).

DISCUSIÓN

La enfermedad KLA en Texas causada por

as *C. gleosporioides* and later as *C. acutatum* based on molecular characterization of ITS region (Brown *et al.*, 1996). Our study confirms that *C. acutatum* is the causal agent of KLA in Mexican lime trees. Conclusion was based on rDNA repeat region (including internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2 and the gene encoding 5.8S rRNA) and *G3PD* gene nucleotide sequence, species specific amplification product of 490 bp using primers *CaInt2* and ITS4, and pathogenicity assays on different citrus cultivars including Mexican lime. Using ITS region of rDNA sequence information, species of *Colletotrichum* isolates from strawberry and citrus were determined (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996). This region of sequences and *G3PD* sequence data was also used to differentiate KLA and PDF isolates and to confirm that KLA and PDF diseases are caused by *C. acutatum* KLA and PDF strains that have distinct phylogenetic lineage (Peres *et al.*, 2008). Although it is difficult to differentiate PFD and KLA isolates based on morphological characters, they are genetically distinct (Brown *et al.*, 1996). Species identification of *C. acutatum* can be performed by selective amplification of part of ITS-5.8S rDNA region using specific primer *CaTnt2* in combination with primer ITS4 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). However, it is important to note that in recent years, the taxonomy of *C. acutatum* has been extensively revised due to sequencing studies of different genes that has allowed the description of new species in the collection of isolates that were formerly identified as *C. acutatum* (Shivas and Tan, 2009).

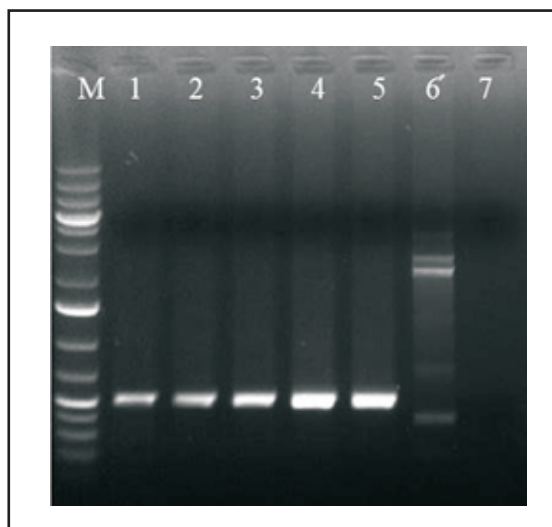


Figura 3. Identificación de aislados de KLA de Texas utilizando primers específicos *CaInt2* y ITS4 para *Colletotrichum acutatum*. Las bandas 1-5 son los aislados de KLA, la banda 6 de ADN de *Fusarium solani*, banda 7 de control no platilla y M = 1 kb más marcadores moleculares (Fermentas).

Figure 3. Identification of KLA isolates from Texas using species specific primers *CaInt2* and ITS4 for *Colletotrichum acutatum*. Lanes 1-5 KLA isolates, lane 6 *Fusarium solani*, lane 7 non template control DNA and M= 1kb plus Molecular marker (Fermentas).

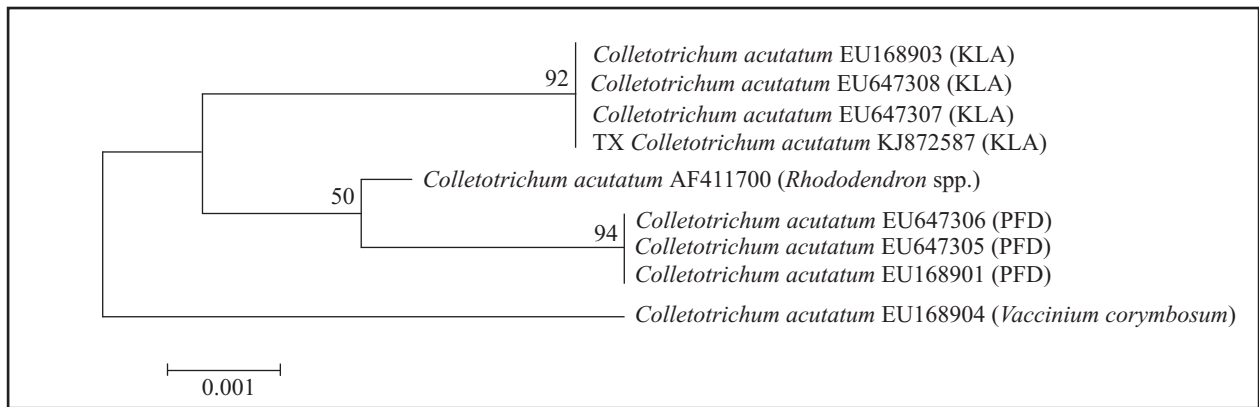


Figura 4. Árbol filogenético (método de agrupamiento- de- vecinos) derivado de las secuencias de ITS1, 5.8S rRNA, y del ITS2 de aislado de antracnosis del limón (KLA) proveniente de Texas (número de acceso: KJ872587) y secuencias publicadas en el GenBank. Porcentaje de árboles replicados en el que los taxones se agruparon todos juntos en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura y el árbol filogenético fue construido usando MEGA6. Los aislamientos de KLA y de la caída prematura de los frutos (PFD) son de cítricos y de *Colletotrichum acutatum* Acceso: EU168904, AF411700 y fueron aislados de arándano y *Rhododendron* spp, respectivamente.

Figure 4. The phylogenetic tree (Neighbor-Joining method) derived from the ITS1, 5.8S rRNA, and ITS2 sequences of Texas key lime anthracnose (KLA) isolate (Accession number: KJ872587) and published sequences in the GenBank. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and the phylogenetic tree was constructed using MEGA6. KLA and postbloom fruit drop (PFD) isolates are from citrus and *Colletotrichum acutatum* Accession: EU168904, AF411700 are isolates from blueberry and *Rhododendron* spp., respectively.

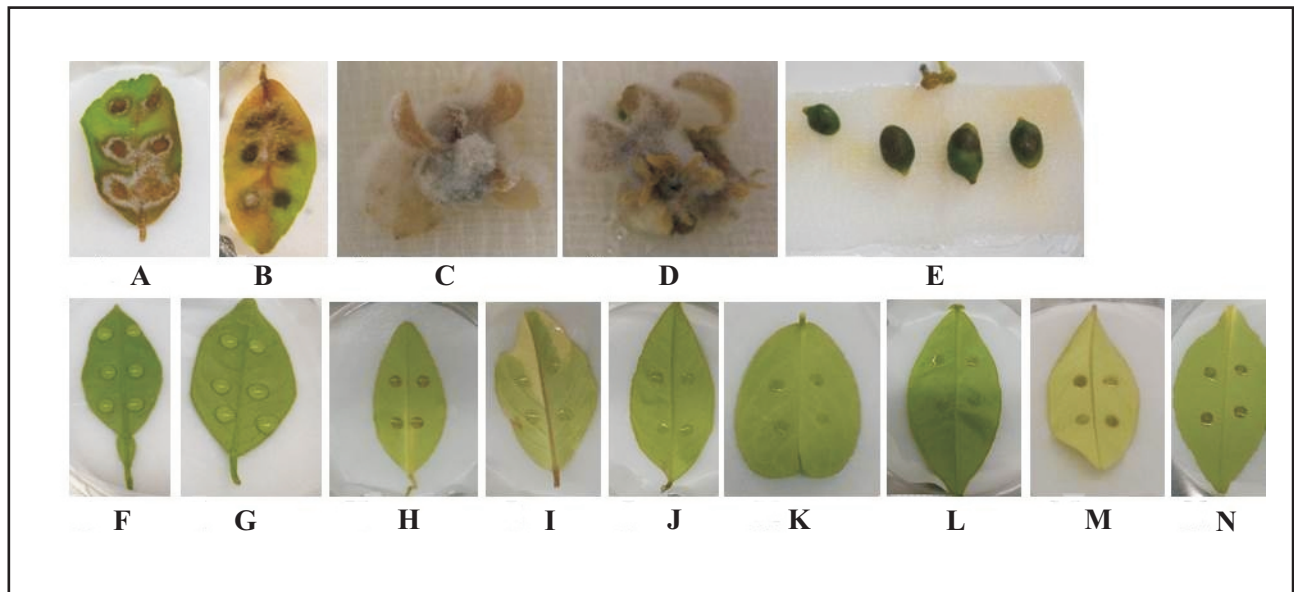


Figura 5. Pruebas de patogenicidad en diferentes cultivos de cítricos. Las hojas caídas, flor y frutos fueron inoculados con aislado de *Colletotrichum acutatum* el cual fue obtenido de tejido afectado por antracnosis de la keylime y fotografiados 6 d después de la inoculación. Hoja del limón mexicano sin espina (A) y la flor (C), hoja de limón mexicano común (B), flor (D) y frutos inmaduros (E) y hojas de toronja Río Red (F), naranja dulce Valencia (G), limón Bearss (H), limón rosa Eureka (I), limequat Eustis (J), limón Ponderosa (K), limón kaffir (L), limón sin semillas Lisboa (M), y limón Meyer (N).

Figure 5. Pathogenicity tests on different citrus cultivars. Detached leaf, flower, and fruit were inoculated with *Colletotrichum acutatum* isolate obtained from Key lime anthracnose affected tissue and photographed 6 d after inoculation. Thornless Mexican lime leaf (A) and flower (C), Common Mexican lime leaf (B), flower (D), and immature fruit (E) and leaves of Rio Red grapefruit (F), Valencia sweet orange (G), Bearsse lime (H), pink Eureka lemon (I), Eustis limequat (J), Ponderosa lemon (K), kaffir lime (L), seedless Lisbon lemon (M), and Meyer lemon (N).

Gloeosporium limetticum Clausen (Clausen, 1912) en limón mexicano fue reportada por Timmer (1978). El nombre del patógeno fue modificado a *C. gleosporioides* y más tarde como *C. acutatum* basados en la caracterización molecular de la región ITS (Brown *et al.*, 1996). Nuestro estudio confirma que el *C. acutatum* es el agente causal del KLA en arboles de limón mexicano. Esta conclusión fue basada en la repetición de la región del rDNA (incluyendo espaciadores internos transcritos (ITS) 1 y 2 y el gen que codifica 5.8S rRNA) y de la secuencia de nucleótidos del gen *G3PD*, el producto de amplificación específica de especies de 490 pb utilizando primers *CaInt2* e *ITS4*, y los ensayos de patogenicidad en diferentes cítricos incluyendo el limón mexicano. Utilizando la región ITS de la secuencia del ADNr, se determinaron las especies de *Colletotrichum* aislados de fresa y cítricos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996). Esta región de secuencias y los datos de la secuencia *G3PD* también se utilizaron para diferenciar los aislados de KLA y PFD y para confirmar que las enfermedades KLA y PFD son causados por *C. acutatum*, así como las cepas de KLA y PFD que tienen linaje filogenético distinto (Peres *et al.*, 2008). Aunque es difícil de diferenciar los aislados de PFD y KLA basándose únicamente en caracteres morfológicos, ellos son genéticamente muy distintos (Brown *et al.*, 1996). La identificación de especies de *C. acutatum* se puede realizar por amplificación selectiva de una parte de la región ITS-5.8S del ADNr utilizando *CaTnt2* como primer específico en combinación con el primer *ITS4* (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante recalcar que en los últimos años, la taxonomía del *C. acutatum* ha sido extensamente revisada debido a estudios de secuenciación de diferentes genes que han permitido la descripción de nuevas especies en la colección de aislados que anteriormente fueron identificados como *C. acutatum* (Shiva and Tan, 2009).

Las pruebas de patogenicidad en hojas, frutas y flores revelaron que los hongos aislados obtenidos en este estudio fueron sólo patógenos para el limón mexicano con espinas y el limón mexicano común, mientras que ninguno de los inoculados de *C. acutatum* tiro las hojas de otras variedades pero desarrollaron lesiones necróticas. Esto confirmó los resultados de los reportes anteriores de que únicamente los aislamientos de KLA causan la enfermedad KLA en el follaje de los limoneros mexicanos (Brown *et al.*, 1996). Se encuentra reportado también que los aislados de KLA causaron necrosis a aproximadamente 30 al 60% del área foliar de las hojas inoculadas de lima mientras que los aislamientos de PFD no formaron lesiones necróticas en las hojas inoculadas de lima (Peres *et al.*, 2008). Por otra parte, las flores de naranjo dulce inoculadas con aislamientos de KLA, presentaron síntomas de PFD (Agostini *et al.*, 1992; Timmer *et al.*, 1994). Un estudio reciente utilizando aislamientos de *C. acutatum* de antracnosa reporta haber afectado a la fresa, al helecho y al limón mexicano; mientras que “ripe-rot” afectó al arándano y el PFD afectó a la naranja dulce demostrando que es poco probable que una cepa patógena de un host se traslade a otro host y provoque una epidemia (MacKenzie *et al.*, 2009).

Pathogenicity tests on leaves, fruit, and flowers revealed that the fungal isolates obtained in this study were pathogenic only to thornless Mexican lime and common Mexican lime while none of *C. acutatum* inoculated detached leaves of other cultivars developed necrotic lesions. It confirms the results of previous reports that only KLA isolates cause KLA disease on Mexican lime foliage (Brown *et al.*, 1996). It was reported that KLA isolates caused necrosis of about 30 to 60% leaf area of Key lime leaves inoculated while PFD isolates produced no necrotic lesions on inoculated Key lime leaves (Peres *et al.*, 2008). Moreover, sweet orange flowers inoculated with KLA isolates produced PFD symptoms (Agostini *et al.*, 1992; Timmer *et al.*, 1994). A recent study using *C. acutatum* isolates from anthracnose affected strawberry, leatherleaf fern, and Mexican lime; ripe-rot affected blueberry, and PFD affected sweet orange showed that it is unlikely that a pathogenic strain from one host would move to another host and result in an epidemic (MacKenzie *et al.*, 2009).

Our pathogenicity tests confirmed earlier reports by Knorr *et al.* (1957) that Bearss lime is resistant to KLA. These results are very important for Mexican lime producers as they largely export Bearss lime and Mexican lime fresh fruit and lime oil to the US market. Recent drop in lime production in Mexico due to severe weather and devastating diseases such as Huanglongbing resulted in lime crisis and drastic price increase in the US. This is the first study that report nucleotide sequence data for *C. acutatum* causing KLA in Mexican lime in Texas and pathogenicity tests for isolated *C. acutatum* on different citrus cultivars to confirm the identity of pathotype.

CONCLUSIONS

The causal agent for KLA disease in Texas was confirmed to be *C. acutatum* based on fungal morphology, nucleotide sequence data, and pathogenicity tests. This fungus was earlier reported as *Gloeosporium limetticum* Clausen (Timmer, 1978). Pathogenicity tests on different citrus cultivars showed that *C. acutatum* is only pathogenic to thornless Mexican lime and common Mexican limes while other citrus cultivars are resistant to this pathogen. Different plant parts of thornless Mexican lime and common Mexican lime including flowers, fruit, and leaves were highly susceptible to *C. acutatum* infection.

Acknowledgements. The authors sincerely thank Dr. Juan C. Melgar, Ms. Beatriz Contreras, and Mrs. Hilda S. del Rio for translation of abstract text from English to Spanish.

LITERATURA CITADA

- Agostini JP, Timmer LW, and Michell DJ. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gleosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1377-1382.
- Boriss H and Huntrods D. 2013. Citrus profile. Agricultural marketing resource center. http://www.agmrc.org/commodities_products/fruits/citrus/citrus-profile/ (consulted, May 2014).

Las pruebas de patogenicidad confirmaron los reportes anteriores de Knorr *et al.* (1957), quienes mencionan que el limón Bearss es resistente a KLA. Estos resultados son muy importantes para los productores de limón mexicano, ya que ellos son los que exportan en gran parte el limón Bearss, limón mexicano y aceite de limón para el mercado estadounidense. La reciente caída en la producción de limón en México debido a condiciones meteorológicas adversas y enfermedades devastadoras como el Huanglongbing, dieron como resultado una fuerte crisis de limón y un drástico aumento del precio en los EE.UU. Este es el primer estudio que reporta datos de la secuencia de nucleótidos de *C. acutatum* causante del KLA en limón mexicano en Texas así como pruebas de patogenicidad para aislados de *C. acutatum* en diferentes cultivos de cítricos para confirmar la identidad del patotipo.

CONCLUSIONES

El agente causal de la enfermedad de KLA en Texas se confirmó ser el *C. acutatum* de acuerdo a la morfología de los hongos, datos de la secuencia de nucleótidos y pruebas de patogenicidad. Este hongo se había reportado anteriormente como *Gloeosporium limetticolum* Clausen (Timmer, 1978). Las pruebas de patogenicidad en diferentes cultivos de cítricos mostraron que el *C. acutatum* únicamente es patogénico para el limón mexicano sin espinas y el limonero mexicano común, mientras que otros cultivos de cítricos son resistentes a este patógeno. Diferentes partes de la planta del limón mexicano sin espinas y del limón mexicano común, incluidas las flores, frutos y las hojas fueron muy susceptibles a la infección por *C. acutatum*.

Agradecimientos. Los autores agradecen sinceramente al Dr. Juan C. Melgar, Sra. Beatriz Contreras y a la Sra. Hilda S. del Río por la traducción del resumen del Inglés al Español.

- Brown AE, Sreenivasaprasad S, and Timmer LW. 1996. Molecular characterization of slow-growing range and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.
- Burnett HC. 1972. Lime anthracnose. Fla. dept. of agr. and cons. Serv. Plant Pathology. Circular no. 116.
- Chen HQ, Dekkers KL, Rollins JA, Ko NJ, Timmer LW, and Chung KR. 2005. A gene with domains related to transcription regulation is required for pathogenicity in *Colletotrichum acutatum* causing key lime anthracnose. *Mol. Plant Pathology*. 6:513-525.
- Clausen RE. 1912. A new fungus concerned in withertip of varieties of *Citrus medica*. *Phytopathology* 2:217-236.
- Denham TG. 1979. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. *PANS* 25:30-36.
- Fawcett HS. 1936. Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Book.co., New York. 656p.
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymon M, and Shabi E. 2000. Molecular analysis of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608-614.
- Guerber JC, Liu B, and Correl JC. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mt DNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872-895.
- Hyde KD, Cai L, Cannon PE, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liw ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, and Zang JZ. 2009. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-182.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Knorr LC, Suit RF, and Ducharme EP. 1957. Handbook of citrus diseases in Florida. Univ. Fla. Agr. Exp. Sta. Bull. 587:77-79.
- MacKenzie SJ, Peres NA, Barquero MP, Arauz LF, and Timmer LW. 2009. Host range relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. *Phytopathology* 99:620-631.
- Morton JF. 1987. Fruits of warm climates. Creative Resource Systems, Inc. Winterville, N.C., USA. 168-172p.
- Peres NAR, Souza NL, Peever TL, and Timmer LW. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gleosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88:125-130.
- Peres NA, MacKenzie SJ, Peever TL, and Timmer LW. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 98:345-352.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Shivas RG, Tan YP. 2009. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondii* sp. Nov. *Fungal Diversity* 39:111-122.
- Sreenivasaprasad S, Mills PR, and Brown AE. 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer I enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.* 98:186-188.
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE, and Mills PR. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*. 45:650-655.
- Sutton, BC. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 695pp.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Timmer LW. 1978. Identification of lime anthracnose in Texas. *J. Rio Grande Hort. Soc.* 32:35-38.
- Timmer LW, Roberts PD, Chung KR, and Bhatia A. 1994. Postbloom fruit drop. Document SP 165. Fla. Coop. exten. Ser., University of Fla.

White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A.

You B-J, Choquer M, and Chung K-R. 2007. The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus. Mol. Plant Microbe Interactions 20:1149-1160.