



Causal agents of inflorescence rot of *Artocarpus heterophyllus* and association with *Toxoptera aurantii* in Nayarit, Mexico.

Agentes causales de la pudrición de inflorescencias de *Artocarpus heterophyllus* y asociación con *Toxoptera aurantii* en Nayarit, México.

Medina-Tiznado, M. A.¹, Luna-Esquivel, G.^{1,2}, Cambero-Campos, J.^{1,2},
Ramírez-Guerrero, L. G.^{1,2}, Ríos-Velasco, C.³

Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, ¹Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, ²Profesor-Investigador, Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

³Profesor-Investigador, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N parque industrial. C.P. 31570. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Medina-Tiznado, M. A., Luna-Esquivel, G., Cambero-Campos, J., Ramírez-Guerrero, L. G., Ríos-Velasco, C. (2018). Causal agents of inflorescence rot of *Artocarpus heterophyllus* and association with *Toxoptera aurantii* in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp1), e438. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e438>



ABSTRACT

In Mexico, Nayarit is the main state of production of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) and recently the crop has been affected by decay of inflorescences without so far determining the causal agent. The objective of this work was to identify the cause of the jackfruit inflorescence rot in Nayarit and the association of *Aphis* (*Toxoptera*) *aurantii*. Symptomatic inflorescences were collected with wet, dry rot and specimens of aphids associated with inflorescences with rot and mycelium. The samples were collected in jackfruit orchards of the municipalities of San Blas and Compostela, Nayarit, Mexico. Three hundred dissections of disease progression zones were processed from 250 inflorescences and 40 dissections of 20 specimens of aphids. Six fungi of inflorescence and one of aphids were isolated; five were inoculated at a concentration of 1×10^6 per mL and two with segments of PDA with five days old

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 30th 2018.

Accepted/Aceptado: May 2nd 2018.

Available on line/Publicado: October 18th 2018.

RESUMEN

En México, el estado de Nayarit es el principal productor de yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) y recientemente el cultivo ha sido afectado por pudriciones de inflorescencias sin hasta el momento determinar el agente causal. El objetivo fue identificar el agente causal de la pudrición de inflorescencias de yaca en Nayarit y la asociación de *Aphis* (*Toxoptera*) *aurantii*. Durante los meses de mayo a agosto de 2016, se recolectaron inflorescencias sintomáticas con pudriciones húmedas, secas, y especímenes de pulgones asociados a inflorescencias con pudrición y micelio. Las muestras se recolectaron en huertas de yaca de los municipios de San Blas y Compostela, Nayarit, México. Se procesaron 300 disecciones de las zonas de avance de la enfermedad a partir de 250 inflorescencias y 40 disecciones de 20 especímenes de pulgones. Se aislaron seis hongos de inflorescencias y uno de pulgón, cinco se inocularon a concentración de 1×10^6 por mL y dos con segmentos de PDA con micelio de cinco días de edad. La inoculación se realizó con y sin herida en epidermis de inflorescencias, aparentemente sanas y en condiciones de laboratorio. Los siete hongos fueron capaces de reproducir los síntomas de pudrición del primero al quinto día post-inoculación

*Corresponding Author:

Luna Esquivel, Gregorio. Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Km 9 carretera Tepic-Compostela, C. P. 63780 Xalisco, Nayarit, México. E-mail: gollole@hotmail.com

mycelium. The inoculation was done with and without wound in epidermis of apparently healthy inflorescences and in laboratory conditions. The seven fungi were able to reproduce the symptoms of rot from the 1st to the 5th day post-inoculation (dpi). By means of morphological and molecular characters, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer* and *Lasiodiplodia theobromae* were identified as causing the rot of female inflorescences of jackfruit and *F. solani*, *A. flavus*, *R. stolonifer*, *L. theobromae*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella clavata* in male inflorescences in Nayarit, Mexico. Likewise, it was also confirmed that *Aphis (Toxoptera) aurantii* is a vector of *R. stolonifer*.

KEY WORDS

Causal agents, morphological characters, pathogenicity tests, jackfruit.

Introduction

Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) is a fruit tree native to India (APAARI, 2012) that was introduced in Mexico and is mainly cultivated in Nayarit, representing 90 % of the established surface corresponding to 1,130 ha (SIAP, 2016). The success of this fruit lies on the fact it is a fruit tree for exportation, mainly to the United States of America; moreover, its exportation has displaced mango and banana crops regarding established surface (Luna *et al.*, 2013; SIAP, 2016).

Jackfruit is a dioecious species that produces male and female inflorescences all year long (Haq, 2006), the first ones grow mainly from the stem and short axillary branch and the second ones from shoots and terminal branches. In a study performed in Sri Lanka in jackfruit orchards, an 11.7 % of anomalies in inflorescences was reported, these damages were caused by insects and pathogens that were not identified, which made fecundation and fruit setting impossible (Pushpakumara, 2006).

The male inflorescences of jackfruit in Thailand and India represent rots caused by *Rhizopus artocarp* (APAARI, 2012) and *Rhizopus stolonifer* (Ghosh *et al.*, 2015), however, in Florida, USA, *Botrytis* and *R. artocarp* were reported as the causal agents of rot in both types of inflorescence (Crane & Balerdi, 2000). On the matter, Pushpakumara (2006) in Sri Lanka, reported that the presence of black mold on the surface of male inflorescences before their fall, without determining what

(dpi). Mediante caracteres morfológicos y moleculares se identificó a *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer* y *Lasiodiplodia theobromae* como causantes de la pudrición de inflorescencias femeninas de yaca y a *F. solani*, *A. flavus*, *R. stolonifer*, *L. theobromae*, *Aspergillus niger* y *Cunninghamella clavata* en inflorescencias masculinas de yaca, en Nayarit, México. Asimismo, se confirmó que *Aphis (Toxoptera) aurantii* es vector de *R. stolonifer*.

PALABRAS CLAVE

Agentes causales, caracteres morfológicos, pruebas de patogenicidad, yaca.

Introducción

La yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) es un frutal tropical originario de India (APAARI, 2012) que se introdujo a México y se cultiva principalmente en Nayarit representando el 90 % de la superficie establecida que corresponde a 1,130 ha (SIAP, 2016). El éxito del frutal radica en que es un fruto destinado a exportación, principalmente a Estados Unidos de América; además su exportación ha desplazado a los cultivos de mango y plátano en cuanto a superficie establecida (Luna *et al.*, 2013; SIAP, 2016).

La yaca es una especie dioica que produce inflorescencias femeninas y masculinas durante todo el año (Haq, 2006), las primeras se desarrollan principalmente en el tallo y ramas axilares cortas y las segundas en brotes y ramas terminales. En un estudio realizado en Sri Lanka en huertas de yaca, se reportó un 11.7 % de anomalías en inflorescencias, estos daños fueron ocasionados por insectos y patógenos que no fueron identificados, los cuales impidieron la fecundación y amarre de frutos (Pushpakumara, 2006).

Las inflorescencias masculinas de yaca en Tailandia e India presentan pudriciones causadas por *Rhizopus artocarp* (APAARI, 2012) y *Rhizopus stolonifer* (Ghosh *et al.*, 2015), sin embargo, en Florida, USA, se reportó a *Botrytis cinerea* y *R. artocarp* como los causantes de la pudrición en ambos tipos de inflorescencias (Crane & Balerdi, 2000). Al respecto, Pushpakumara (2006) en Sri Lanka, reportó la presencia de un moho negro en la superficie de inflorescencias masculinas antes de su caída, sin determinar el agente causal. En Bangladesh, se reportó la caída del 18.9 % de

the causal agent was. In Bangladesh, the fall of 18.9 % of female flowers damaged by *Rhizopus sp.* (Ghosh, 1994) was reported. The rots caused by *R. artocarp*i and *R. stoloniger* start with humid areas and grayish mycelium, gradually turning black with a dense growth that covers the inflorescence, slowly rotting, mummifying and falling from the tree (Crane & Balerdi, 2000).

In India, during dry periods followed by rainy days, the multiplication of aphids like *Greenidea artocarp*i Westwood and *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (Hemiptera: Aphididae) is favored, both feed on new shoots and jackfruit leaves covered by black mold caused by *R. artocarp*i (Haq, 2006; APAARI, 2012). In Nayarit, Mexico, Rodríguez et al. (2017) reported the presence of *T. aurantii* laying down in male inflorescences of jackfruit, with presence of gray mold, without determining the fungus causing the rot. In citrus fruits, the aphid *T. aurantii*, is reported as a vector for the *citrus tristeza virus* (CTV) reaching a horizontal dissemination among trees due to the flight pattern in short distances (Silva et al., 2001; Patiño-Arellano et al., 2012).

In orchards of jackfruit in Nayarit, Mexico, the presence of male and female inflorescences with humid and brownish dry rot is evident, these start after floral opening. The symptoms in male inflorescences start with humid area over which grayish mycelium grows, later turning dark-grayish on which the aphids lay; in female inflorescences, dry rots develop and extend as the fruit grows. Due to the limited information available and the absence of researches on the matter, the objective of this study was to morphologically and molecularly identify the causal agents of rot inflorescences of jackfruit and the association of *T. aurantii* with the rots.

Material and Methods

Sampling site

The samplings were carried out in orchards with ten-year-old trees at the localities of El Llano (21°24'58"N and 105°11'28"W, 40 masl) and Las Varas, (21°10'13"N ad 105°09'36"W, 24 masl) in the municipalities of San Blas and Compostela, respectively, in the state of Nayarit, Mexico.

Gathering of symptomatic material

A total of 250 inflorescences from commercial orchards were gathered (150 male and 100 female) with

flores femeninas dañadas por *Rhizopus sp.* (Ghosh, 1994). Las pudriciones ocasionadas por *R. artocarp*i y *R. stolonifer*, inician con áreas húmedas y micelio grisáceo, que gradualmente se tornan color negro con un crecimiento denso que cubre la inflorescencia, se pudren lentamente, se momifican y caen del árbol (Crane & Balerdi, 2000).

En India, durante periodos secos seguidos de días lluviosos, se favorece la multiplicación de áfidos como *Greenidea artocarp*i Westwood y *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (Hemiptera: Aphididae), ambos se alimentan de brotes tiernos y hojas de yaca cubiertas por moho negro ocasionado por *R. artocarp*i (Haq, 2006; APAARI, 2012). En Nayarit, México, Rodríguez et al. (2017) reportaron la presencia de *T. aurantii* posando en inflorescencias masculinas de yaca, con presencia de moho gris, sin determinar el hongo causante de la pudrición. En cítricos, el pulgón *T. aurantii*, es reportado como vector del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) logrando una disseminación horizontal entre arboles debido al patrón de vuelo, a distancias cortas (Silva et al., 2001; Patiño-Arellano et al., 2012).

En las huertas de yaca en Nayarit, México, es evidente la presencia de inflorescencias masculinas y femeninas con pudrición húmeda y seca color marrón, estas dan inicio después de la apertura floral. Los síntomas en inflorescencias masculinas inician con áreas humedades sobre las cuales se desarrolla micelio grisáceo, que posteriormente se torna gris-oscuro sobre el cual se posan pulgones; en las inflorescencias femeninas, se desarrollan pudriciones secas que se extienden conforme se desarrolla el fruto. Debido a la limitada información disponible y a la ausencia de investigaciones al respecto, el objetivo del estudio fue identificar morfológica y molecularmente los agentes causales de la pudrición de inflorescencias de yaca y la asociación de *T. aurantii* con las pudriciones.

Material y Métodos

Zona de muestreo

Los muestreos se realizaron en huertas con árboles de 10 años de edad en las localidades de El Llano (21°24'58"N y 105°11'28"O, 40 masl) y Las Varas, (21°10'13"N y 105°09'36"O, 24 masl) en los municipios de San Blas y Compostela, respectivamente, en el estado de Nayarit, México.

symptoms of humid rotting (105 male and 40 female) and dry rotting, (45 male and 60 female) and 20 specimens of brown citrus aphids laying on abundant mycelium in male inflorescences with humid rotting, during the months of May, June, and August, 2016. The biological material (inflorescences and aphids) was recollected into paper bags, then, it was put into dry ice coolers and moved to the lab of Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica (CEMIC 3), of the Universidad Autónoma de Nayarit for the isolation from possible pathogenic microorganisms from the inflorescences and aphids, and for the identification of the brown citrus aphid as a possible vector of fungi causing the rotting of inflorescences of jackfruit.

Isolation of microorganisms

The vegetal tissue (inflorescences) was divided into sections from the zone of advance of the disease (transition zone) of 0.5 cm², and was disinfected with NaClO at 3 % for 2 minutes, the 20 specimens of aphids were dissected in half and were submerged in ethylic alcohol at 70 % for 2 minutes, later the tissue and the aphids were washed using sterile distilled water in three times for 2 minutes and were placed in sterile wipes gauze to dry at room temperature, then they were cultured (150 tissue cuts of male inflorescences, 150 of female ones and 40 of aphids) in petri dishes with culture mean potato dextrose agar (PDA-Bioxon®) and were incubated at 28 °C ± 2 in a bacteriological incubator for 7 d (Novatech®) (Agrios, 2005).

Obtaining of monosporic cultures

The fungi that grew, were isolated and purified in PDA based on the technique described by Manandhar *et al.*, (1995) for the obtaining of monosporic cultures, for their posterior morphological identification at gender level, by means of taxonomic keys of Barnett & Hunter (2006) and pathogenicity tests.

Pathogenicity tests

Preparation of inoculum

Cultures with five days of isolation were used. Ten ml of sterile distilled water were added to each petri dish; the mycelium was mixed using a sterile stick of 6.5 cm and the mixture was recovered in a test tube. Approximately 10 µL were taken from the suspension

Recolecta de material sintomático

Se recolectaron un total de 250 inflorescencias de huertas comerciales (150 masculinas y 100 femeninas) con síntomas de pudrición húmeda (105 masculinas y 40 femeninas) y pudrición seca, (45 masculinas y 60 femeninas) y 20 especímenes de pulgón café posados sobre abundante micelio en inflorescencias masculinas con pudrición húmeda, durante los meses de mayo, junio y agosto del 2016. El material biológico (inflorescencias y pulgones) se recolectó en bolsas de papel, posteriormente se colocó en hieleras de unicel y se trasladó al laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de investigación Científica (CEMIC 3), de la Universidad Autónoma de Nayarit para el aislamiento de posibles microorganismos patógenos a partir de las inflorescencias y del pulgón, e identificación del pulgón café como posible vector de hongos causantes de pudriciones en inflorescencias de yaca.

Aislamiento de microorganismos

Se seccionó el tejido vegetal (inflorescencias) de la zona de avance de la enfermedad (zona de transición) de 0.5 cm², y se desinfectó con NaClO al 3 % por 2 minutos, los 20 especímenes de pulgones se disertaron por mitad y se sumergieron en alcohol etílico al 70 % por 2 minutos, posteriormente el tejido y los pulgones se enjuagaron con agua destilada estéril en tres tiempos por 2 minutos y se colocaron en sanitas estériles para su secado a temperatura ambiente, subsecuentemente se sembraron (150 cortes de tejido de inflorescencias masculinas, 150 de femeninas y 40 de pulgones) en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA-Bioxon®) y se incubaron a 28 °C ± 2 en una cámara de crecimiento por 7 d (Novatech®) (Agrios, 2005).

Obtención de cultivo monospórico

Los hongos que crecieron, se aislaron y purificaron en PDA con base a la técnica descrita por Manandhar *et al.*, (1995) para la obtención de cultivos monospóricos, para su posterior identificación morfológica a nivel de género, mediante claves taxonómicas de Barnett & Hunter (2006) y pruebas de patogenicidad.

Pruebas de patogenicidad

Preparación de inóculo

Se utilizaron aislados con 5 días de desarrollo. A cada caja de Petri se le adicionaron 10 mL de agua destilada estéril, se mezcló el micelio con ayuda de un palillo estéril de

(with the help of a three-milliliter hypodermic needle) to perform the counting in a hemocytometer (Paul Maurenfield®), thus adjusting the suspension of spores of 1×10^6 by mL (Rodríguez *et al.*, 2002). The isolated cultures of fungi that did not develop enough conidia, the inoculum was segments of PDA of 0.2 cm² with six-day-old mycelium.

Inoculum and re-isolation

The isolated fungi of rots (humid and dry) from inflorescences (male and female) and from aphids, were inoculated in inflorescences with a healthy look from the same type from which they were isolated. Each isolated culture was inoculated by means of two procedures: with wound and with no wound, in 10 inflorescences for each procedure, plus 10 controls (standard of comparison), where each inflorescence represented one repetition. The inflorescences used had an average size of 9 cm in females and 5 cm in males. After being inoculated, they were put into a sterile transparent plastic box of 26 x 26 cm, containing a sterile humid sanita, and later they were incubated at room temperature ($23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3$) and 74 % of relative humidity. The wound in the inflorescences consisted of 0.5 cm² with a dissecting knife, in which the suspension of spores of 1×10^6 by mL was placed using a sterile cotton swab. The inflorescences with no wounds were inoculated with the same concentration of spores directly on the epidermis with a sterile cotton swab. Only sterile distilled water was added to the control inflorescences. The fungi with not enough spores, were inoculated using segments (explants) of PDA with mycelium growth of 0.2 cm².

The inoculated inflorescences were systematically analyzed every 24 hours and the ones showing symptoms of rotting were re-isolated in PDA for their confirmation through their morphological characters (Barnett & Hunter, 2006)

Morphological identification

From their growth in PDA, their characters qualitative macroscopic morphological and quantitative, were described. Semi-permanent preparations dyed with lactophenol blue solution (HYCEL®) were made, and were observed under an optical microscope (Nikon Eclipse E400) with a camera integrated. For the determination of the gender of the fungi, the Barnett & Hunter keys were used (2006).

6.5 cm y la mezcla se recuperó en un tubo de ensayo. Se tomó 10 µL aproximadamente de la suspensión (con ayuda de una aguja hipotérmica de 3 mL) para realizar el conteo en un hemocitómetro (Paul Maurenfield®), y así ajustar la suspensión de esporas de 1×10^6 por mL (Rodríguez *et al.*, 2002). En los aislados de hongos que no desarrollaron suficientes conidios, el inóculo fue segmentos de PDA de 0.2 cm² con micelio de 6 días de edad.

Inoculación y re-aislamiento

Los hongos aislados de pudriciones (húmedas y secas) de inflorescencias (masculinas y femeninas) y de pulgones, fueron inoculados en inflorescencias con apariencia sana del mismo tipo del que se aislaron. Cada aislado se inoculó mediante dos procedimientos: con herida y sin herida, en 10 inflorescencias para cada procedimiento, más 10 testigos, donde cada inflorescencia representó una repetición. Las inflorescencias utilizadas tuvieron un tamaño promedio de 9 cm en las femeninas y de 5 cm en las masculinas. Después de ser inoculadas, se colocaron dentro de una caja de plástico transparente estéril de 26 x 26 cm, que contenía una sanita estéril húmeda, y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente ($23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3$) y 74 % de humedad relativa. La herida en las inflorescencias consistió de 0.5 cm² con navaja de disección estéril, en la cual se colocó suspensión de esporas de 1×10^6 por mL con ayuda de un hisopo estéril. Las inflorescencias sin herida, se inocularon con la misma concentración de esporas directamente en la epidermis con un hisopo estéril. A las inflorescencias testigos, solo se les agregó agua destilada estéril. Los hongos sin suficiente esporas, se inocularon usando segmentos (explantes) de PDA con crecimiento micelial de 0.2 cm².

Las inflorescencias inoculadas se revisaron sistemáticamente cada 24 horas y las que mostraron síntomas de pudrición, se re-aislaron en PDA para su confirmación mediante sus caracteres morfológicos (Barnett & Hunter, 2006).

Identificación morfológica

A partir de su crecimiento en PDA, se describieron sus caracteres morfológicos macroscópicos cualitativos y cuantitativos. Se hicieron preparaciones semipermanentes teñidas con azul de lactofenol (HYCEL®), y se observaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) con cámara integrada. Para la determinación del género de los hongos, se usaron las claves de Barnett & Hunter (2006).

Molecular identification

DNA extraction

This practice was performed from a three-day growth culture in a solid culture mean PDA at 28°C. The mycelium of the fungus was harvested with a sterile plastic spatula, and was placed in a mortar for its maceration 500 µL of reaction damper (Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 %, pH 8) hot (70 °C). Afterwards, 500 µL of the reaction damper were added for a better maceration of the mycelium. The macerated mycelium was recovered in a sterile microtube of 1.5 mL and was incubated at 70 °C for 60 minutes in a thermoblock, then 300 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), was mixed in a vortexer for 10 minutes and was centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes. The aqueous phase was transferred into a new sterile microtube, 2 µL of RNase (ribonuclease) were added and was left resting at 37°C for 30 minutes, then 300 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) were added, it was mixed in a vortexer for 5 minutes and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes, and supernatant was recovered and the same volume of chloroform (approximately 400 µL) was added, then mixed by inversion and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes, the aqueous phase was transferred into a new sterile tube, to which 500 µL of isopropyl alcohol were added and 1/10 of sodium acetate 3 M pH=5.2, was mixed by inversion, centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes and the supernatant was disposed of. The pellet was washed with cold ethanol at 70 % (approximately 400 µL), centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes and was finally left to dry, they were resuspended in aliquots of 30-50 µL of distilled purified water and were kept in refrigeration (Ahrens & Seemüller, 1992).

DNA amplification

The obtained DNA was visualized by gel electrophoresis of agarose at 1 % and then it was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS 4 and 5) from the rDNA (ribosomal DNA), using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). The reaction mixture for PCR was prepared in a final volume of 506 µL, sterile ultrapure water (349.25 µL), damper solution 10X (11 µL), MgCl₂ at 2.5 mM (66 µL), dNTPs 10 µL (11 µL), starters ITS4 and ITS5 at 1 µL (11 µL from each one) and Taq polymerase 2.75 µL. The products of PCR were examined by gel electrophoresis

Identificación molecular

Extracción de DNA

Esta práctica se realizó, a partir de un cultivo de 3 días de crecimiento en medio de cultivo sólido PDA a 28 °C. El micelio del hongo se cosechó con una espátula de plástico estéril, y se colocó en un mortero para su maceración con 500 µL de amortiguador de reacción (Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 %, pH 8) caliente (70 °C). Posteriormente, se adicionaron 500 µL de amortiguador de reacción para una mejor maceración del micelio. El micelio macerado se recuperó en un microtubo estéril de 1.5 mL y se incubó a 70 °C por 60 minutos en un termoblock, después se adicionaron 300 µL fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. La fase acuosa, se transfirió a un microtubo estéril nuevo, se le adicionaron 2 µL de RNAasa y se dejó reposar a 37 °C por 30 minutos, después se adicionó 300 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex por 5 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se adicionó un volumen igual de cloroformo (400 µL aproximadamente), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo estéril, al que se adicionaron 500 µL de isopropanol frío y 1/10 de acetato de sodio 3 M pH=5.2, se mezcló por inversión, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol frío al 70 % (400 µL aproximadamente), se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos y finalmente se dejó secar la pastilla, se re-suspendieron en alícuotas de 30-50 µL de agua MQ estéril y se mantuvieron en refrigeración (Ahrens & Seemüller, 1992).

Amplificación del DNA

El DNAg obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y subsecuentemente se usó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 y 5, por sus siglas en inglés) del DNAr, usando los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 506 µL, agua ultrapura estéril (349.25 µL), solución amortiguadora 10X (11 µL), MgCl₂ a 2.5 mM (66 µL), dNTPs 10 µL (11 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 1 µL (11 µL de cada uno) y Taq polimerasa 2.75 µL. Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Posteriormente, los productos fueron secuenciados por MacroGen Company (Rockville, Maryland, USA). Las secuencias obtenidas se compararon

in agarose at 1 %. Subsequently, the products were sequenced by Macrogen Company (Rockville, Maryland, USA). The obtained sequences were compared with the data base from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the algorithm of BLAST (Altschul *et al.*, 1990), to verify the percentage of identity corresponding to the species analyzed.

Results and Discussion

Out of the 300 fragments of tissue cultivated in PDA with advanced rot in inflorescences, the fungi isolated were: *Fusarium solani* (3.2 %), *Aspergillus niger* (4 %), *Aspergillus flavus* (5.6 %), *Rhizopus stolonifer* (20 %), *Cunninghamella clavata* (24 %) and *Lasioidiplodia theobromae* (43.2 %), which tested positive for the pathogenicity tests, when causing the rotting of the inflorescences from the inoculated area, showing symptoms between the first and fifth day post-inoculation (dpi), reaching total rotting of inflorescences at the fifth and ninth dpi. From the aphid specimens, only *R. stolonifer* was isolated (100 %).

Fusarium solani, in both types of inflorescences, caused humid rot with pink mycelium (Figure 1 and 2). With the two procedures of inoculation (with and without wound), the symptoms were reproduced on the male inflorescences with wound (Table 1). In jackfruit, the fungus *Fusarium* spp., has only been reported to affect roots in Florida, USA (Crane & Balerdi, 2000). It is also reported in pumpkin fruits (*Cucurbita maxima* Duchesne and *Cucurbita pepo*) *F. solani* f. sp. *cucurbitae* W. C. Snyder and H. N. Hans Raza 1 and *F. solani* f. sp. *cucurbitae* L. (García Jiménez *et al.*, 1997; Castroagudin *et al.*, 2009), however, a relation between *F. solani* e inflorescences of jackfruit, therefore, it is considered the first report of *F. solani* as pathogenic for the male and female inflorescences of jackfruit in Nayarit, Mexico. In lemon fruits (*Citrus limon* L. Burm. f.), is reported to *F. oxysporum* as causal agent of rot (Fogliata *et al.*, 2013), while in flowers in fruits of sweet pepper (*Capsicum annum* L. cv. Sympathy MZ) under greenhouse conditions, *F. subglutinans* was identified (Utkhede & Mathur, 2003).

Aspergillus niger, caused dry and humid rot in a 90 % in male inflorescences tested, over which a softening of the tissue was observed, and humid rot with abundant black sporulation that invaded the entire tissue (Table 1, Figure

con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies analizadas.

Resultados y Discusión

De los 300 fragmentos de tejidos sembrados en PDA con avance de pudrición en inflorescencias, se aislaron los hongos: *Fusarium solani* (3.2 %), *Aspergillus niger* (4 %), *Aspergillus flavus* (5.6 %), *Rhizopus stolonifer* (20 %), *Cunninghamella clavata* (24 %) y *Lasioidiplodia theobromae* (43.2 %), los cuales dieron positivo a las pruebas de patogenicidad, al ocasionar la pudrición de las inflorescencias a partir del área inoculada, mostrando síntomas entre el primer y quinto día post-inoculación (dpi), logrando la pudrición total de inflorescencias al quinto y noveno dpi. De los especímenes de pulgón, sólo se aisló a *R. stolonifer* (100 %).

Fusarium solani, en ambos tipos de inflorescencias, ocasionó pudrición húmeda con micelio color rosa (Figura 1 y 2). Con los dos procedimientos de inoculación (con y sin herida), se reprodujeron los síntomas en las inflorescencias masculinas, mientras que en las femeninas, solo se presentó pudrición en las inflorescencias con herida (Cuadro 1). En yaca, el hongo *Fusarium* spp., sólo ha sido reportado afectando raíces en Florida, USA (Crane & Balerdi, 2000). También es reportado en frutos de calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne y *Cucurbita pepo*) *F. solani* f. sp. *cucurbitae* W. C. Snyder y H. N. Hans Raza 1 y *F. solani* f. sp. *cucurbitae* L. (García-Jiménez *et al.*, 1997; Castroagudin *et al.*, 2009), sin embargo, no se ha reportado una asociación entre *F. solani* e inflorescencias de yaca, por lo tanto, se considera que es el primer reporte de *F. solani* como patógeno para las inflorescencias masculinas y femeninas de yaca en Nayarit, México. En frutos de limón (*Citrus limon* L. Burm. f.), se reporta a *F. oxysporum* como agente causal de pudrición (Fogliata *et al.*, 2013), mientras que en flores y frutos de pimientos dulces (*Capsicum annum* L. cv. Sympathy MZ) bajo invernadero, se identificó a *F. subglutinans* (Utkhede & Mathur, 2003).

Aspergillus niger, causó pudrición seca y húmeda en un 90 % en inflorescencias masculinas probadas, sobre la cual se observó un reblandecimiento del tejido y pudrición húmeda con abundante esporulación negra que invadió la totalidad del tejido (Tabla 1, Figura 2). Esta especie, es un patógeno

2). This species, is a pathogen of economic importance mainly in post-harvest fruit from several fruit trees, which is why it is considered the first time in which it affects male inflorescences of jackfruit in Nayarit, Mexico. In this state, Ragazzo *et al.* (2011) report it for causing grayish zone over the seed vessel and softening of the tissue in post-harvest fruits of jackfruit. In post-harvest fruits of cherries (*Prunus cerasus* L.), apple (*Malus domestica* Borkh) and grapes (*Vitis vinifera* L.), this pathogen caused humid areas with dark pulverulence spores (Latorre *et al.*, 2002; Thomidis & Exadaktylou, 2012); while in lemons (*Citrus limon* L.) and pomelo (*Citrus paradisi* Macfad), tiny dark-brownish stains developed 7 days after inoculation covering the epidermis (Liaquat *et al.*, 2016), in the same way, the damage of necrotic stains on ginger leaves (*Zingiber officinale* Rosc.) was reported, causing defoliation (Pawar *et al.*, 2008).

Even that there are no reports on the effect of *Aspergillus flavus* on the crop of jackfruit trees from Nayarit, Mexico, it was found that this fungus caused dry rot in male and female inflorescences over which green-yellowish sporulation developed (Figure 1 and 2; Table 1), which is why it is considered the first time this fungus is reported a pathogen of this species. In the particular case of *A. flavus*, is not a frequent pathogen of fruits, nevertheless, it has been isolated from sour lemon (*Citrus aurantifolia* Swingle) (Bamba & Sumball, 2005) and from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), causando rots in post-harvest (Ochoa *et al.*, 2007), in the same manner, it has been detected in almond seeds (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) (Palumbo *et al.*, 2014) and in maize grains in pre-harvest, causing 20 % of infection (Setamou *et al.*, 1997). In addition to being considered the main producer of cancerous aflatoxins in seed all over the world (Marino *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2014).

The symptoms of soft rot caused by *Rhizopus stolonifer* in male and female inflorescences, started with a humid stained between the first and fifth day, which later turned brown with white mycelium and black sporulation (Table 1), these symptoms coincide with the ones reported by Ghosh *et al.* (2015) in male inflorescences and jackfruits trees in India. Ghosh (1994) mentions that this disease caused *R. stolonifer*, is very common in rainy zones and can present in jackfruits in pre and post-harvest. Nelson (2005), reported that *R. oryzae* and *R. artocarp* cause the same symptoms in jackfruits, causing losses from 15 to 32 %. This pathogen also causes infections in

de importancia económica principalmente en frutos poscosecha de diversos frutales, por lo que se considera que es la primera vez que se reporta afectando inflorescencias masculinas de yaca en Nayarit, México. En éste estado Ragazzo *et al.* (2011) lo reportan causando zonas de color pardo sobre el pericarpio y reblandecimiento del tejido en frutos poscosecha de yaca. En frutos poscosecha de cereza (*Prunus cerasus* L.), manzana (*Malus domestica* Borkh) y uvas (*Vitis vinifera* L.), este patógeno ocasionó áreas húmedas con esporas pulverulentas de color negro (Latorre *et al.*, 2002; Thomidis & Exadaktylou, 2012); mientras que en limones (*Citrus limon* L.) y pomelo (*Citrus paradisi* Macfad), se desarrollaron pequeñas manchas de color marrón oscuro 7 días después de la inoculación cubriendo la epidermis (Liaquat *et al.*, 2016), asimismo, se reportó el daño de manchas necróticas en hojas de jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) ocasionando defoliación (Pawar *et al.*, 2008).

Aun cuando no existen reportes de afectación de *Aspergillus flavus* en el cultivo de yaca en árboles de Nayarit, México, se encontró que este hongo ocasionó pudrición seca en inflorescencias masculinas y femeninas sobre la cual se desarrolló esporulación verde amarillenta (Figura 1 y 2; Tabla 1), por lo que se considera que es la primera vez que se reporta a este hongo como patógeno de esta especie. En el caso particular de *A. flavus*, no es un patógeno frecuente de frutos, sin embargo, se ha aislado de limón agrio (*Citrus aurantifolia* Swingle) (Bamba & Sumball, 2005) y de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), ocasionando pudriciones en poscosecha (Ochoa *et al.*, 2007), de la misma manera, se ha detectado en semillas de almendras (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) (Palumbo *et al.*, 2014) y en granos de maíz en precosecha, ocasionando 20 % de infección (Setamou *et al.*, 1997). Además de ser considerado el principal productor de aflatoxinas cancerígenas en semillas en todo el mundo (Marino *et al.*, 2009; Horn *et al.*, 2014).

Los síntomas de pudrición blanda ocasionados por *Rhizopus stolonifer* en inflorescencias masculinas y femeninas, iniciaron con una mancha húmeda entre el primer y quinto día, que posteriormente se tornó café con micelio blanco y esporulación negra (Figuras 1 y 2), cubrió la inflorescencia y finalmente se momificó a los 6 dpi (Tabla 1), estos síntomas coinciden con los reportados por Ghosh *et al.* (2015), en inflorescencias masculinas y frutos de yaca en India. Ghosh (1994) menciona que ésta enfermedad causada por *R. stolonifer*, es muy común en zonas lluviosas y, puede presentarse en frutos de yaca en precosecha y poscosecha. Nelson (2005), reportó

strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.) in post-harvest (Nieto et al., 2011) and in field, causing losses from 50 to 90 % of ripe fruits in Taiwan, provoking similar symptoms to the ones reported in jackfruit inflorescences, however, the flowers remained asymptomatic (Lin et al., 2017). Latorre et al. (2002), reproduced the soft and aqueous rots in inoculated grapes, on lesions 48 hours after post-inoculation with *R. stolonifer*.

The isolated culture of *R. stolonifer* obtained from aphids, tested positive in a 70 and 40 % of male inflorescences, when being inoculated with and without wounds, respectively. The symptoms were observed three dpi, and caused total rot on the fifth dpi, the infection started with a humid area, with cottony white mycelium, which turned black and completely covering the inflorescence. The aphid of jackfruit in Nayarit corresponds to *Aphis (Toxoptera) aurantii* (Boyer de Fonscolombe), previously reported by Rodríguez et al., (2017). In India and Thailand, this insect has been reported to feed on new shoots of jackfruit, causing rolling on the leaves covered by black mold (Haq, 2006; APAARI, 2012). The importance of this aphid consists on its capacity to spread diseases, in citrus fruits, it is responsible for the spreading of the CTV (Silva et al., 2001; Patiño-Arellano et al., 2012).

Cunninghamella clavata, caused a soft rot in male inflorescences (Table 1), over which the circular white mycelium was developed (Figure 2), which grew evenly until entirely covering the inflorescences; to this day, this fungus has not been reported as a phytopathogen, which is why a relation between *C. clavata* and jackfruit inflorescences has not been reported, therefore, it is the first time it is reported as pathogenic for the male inflorescences of jackfruit in Nayarit, Mexico. In Brazil, it has been isolated from samples in semiarid soils without having more data (Alves et al., 2017). The genera *Cunninghamella* sp. includes species of medical importance such as *C. bertholletiae*, which causes sinusitis, pulmonary and endobronchial zygomycosis on patients with a weak immune system (cancer and diabetes mellitus, in biotechnological procedures), *C. bainieri* metabolizes xenobiotics, aromatic compounds and drugs and *C. elegans* oxidizes the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, oil and degrades the fluoranthene in a PAH (Shiosaki et al., 2001).

Lasiodiplodia theobromae caused soft rot in both types of inflorescences (Table 1), from the inoculated

que *R. oryzae* y *R. artocarp*i, ocasionan los mismos síntomas en frutos de yaca, causando pérdidas de 15 % a 32 %. Este patógeno también causa infecciones en frutos de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) en poscosecha (Nieto et al., 2011) y en campo, ocasionando pérdidas del 50 % al 90 % de fruta madura en Taiwán, provocando síntomas similares a los reportados en inflorescencias de yaca, asimismo, el problema fue más severo durante periodos largos de lluvia, sin embargo, las flores permanecieron asintomáticas (Lin et al., 2017). Latorre et al. (2002), reprodujeron las pudriciones blandas y acuosas en uvas inoculadas, sobre lesiones a las 48 horas post-inoculación con *R. stolonifer*.

El aislado de *R. stolonifer* obtenido de pulgones, dio positivo en un 70 % y 40 % de las inflorescencias masculinas, al ser inoculadas con heridas y sin heridas, respectivamente. Los síntomas se observaron a los tres dpi, y causaron la pudrición total a los cinco dpi, la infección inició con un área húmeda, con micelio blanco algodonoso, que se tornó color negro cubriendo por completo a la inflorescencia. El pulgón de yaca en Nayarit corresponde a *Aphis (Toxoptera) aurantii* (Boyer de Fonscolombe), previamente reportado por Rodríguez et al., (2017). En India y Tailandia este insecto ha sido reportado alimentándose de brotes tiernos de yaca, ocasionando enchinamiento de las hojas cubiertas por moho negro (Haq, 2006; APAARI, 2012). La importancia de este pulgón radica en su capacidad de transmitir enfermedades, en cítricos, es el responsable de la transmisión del virus de la tristeza (CTV) (Silva et al., 2001; Patiño-Arellano et al., 2012).

Cunninghamella clavata, ocasionó una pudrición blanda en inflorescencias masculinas (Tabla 1), sobre la cual se desarrolló un micelio blanco de forma circular (Figura 2), que creció de manera uniforme hasta cubrir por completo a las inflorescencias, a la fecha este hongo no ha sido reportado como fitopatógeno, por lo que no se ha reportado una asociación de *C. clavata* con inflorescencias de yaca, por lo tanto, se considera que es la primera vez que se reporta como patógeno para las inflorescencias masculinas de yaca en Nayarit, México. En Brasil ha sido aislado a partir de muestras de suelo semiáridos sin tener más información (Alves et al., 2017). El género *Cunninghamella* sp., incluye especies de importancia médica como *C. bertholletiae*, la cual ocasiona sinusitis, zigomicosis endobronquial y pulmonar en pacientes con un sistema inmunológico débil (cáncer y diabetes mellitus, en procesos biotecnológicos), *C. bainieri* metaboliza xenobióticos, compuestos aromáticos y fármacos y *C. elegans* oxida los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), petróleo y degrada el fluoranteno en un PAHs (Shiosaki et al., 2001).

area, grayish white mycelium entirely invading the inflorescences was developed (Figure 1, 2). In Taiwan, this pathogen has been reported to cause soft rot in jackfruits, the infection starts with yellowish stain which turns brown and finally gets a dark-brownish color and humid-looking with abundant sporulation of a dark-grayish tone (*Dimocarpus longan* L.) and mango (*Mangifera indica* L.), causing rotting of rachis, raquilla, and flowers five and eight dpi, respectively; the inflorescences of mango turned brown with presence of abundant mycelium (Serrano-Díaz *et al.*, 2013), while in longan, the inflorescences were mummified (Serrano-Díaz *et al.*, 2014).

Lasiodiplodia theobromae, causó pudrición blanda en ambos tipos de inflorescencias (Tabla 1), a partir del área inoculada se desarrolló micelio blanco-grisáceo que invadió por completo las inflorescencias (Figuras 1, 2). En Taiwán, este patógeno ha sido reportado ocasionando pudrición blanda de frutos de yaca, la infección inicia con una mancha amarillenta que se torna café y finalmente adquiere un color marrón oscuro de aspecto húmedo con esporulación abundante de tonalidad grisácea-oscuro (Ni *et al.*, 2008). Este hongo también es patogénico en inflorescencias de longan (*Dimocarpus longan* L.) y mango (*Mangifera indica* L.), causando tizón (pudrición de raquis, raquilla y flores) a los cinco y ocho dpi, respectivamente; las inflorescencias de mango se tornaron color marrón con

Table 1.
Percentage of pathogenicity of fungal isolates when evaluated under laboratory conditions against female and male inflorescences.

Tabla 1.
Porcentaje de patogenicidad de aislados de hongos al ser evaluados bajo condiciones de laboratorio contra inflorescencias femeninas y masculinas.

Phytopathogenic fungus	Inflorescence	Type of inoculation	Pathogenicity tests (%)	Appearance of symptoms (dpi)	Total rot (dpi)
<i>Fusarium solani</i>	Female	With wound	+ (100)	5	9
		Without wound	- (100)	-	-
	Male	With wound	+ (70)	5	6
		Without wound	+ (50)	5	6
<i>Aspergillus niger</i>	Male	With wound	+ (90)	3	7
		Without wound	+ (90)	4	7
<i>Aspergillus flavus</i>	Female	With wound	+ (100)	5	7
		Without wound	- (100)	-	-
	Male	With wound	+ (30)	3	6
		Without wound	+ (50)	4	6
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Female	With wound	+ (70)	1	6
		Without wound	- (100)	-	-
	Male	With wound	+ (70)	1	6
		Without wound	+ (60)	3	5
<i>Cunninghamella clavata</i>	Male	With wound	+ (100)	2	9
		Without wound	+ (100)	2	9
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Female	With wound	+ (40)	3	6
		Without wound	+ (40)	3	6
	Male	With wound	+ (100)	3	6
		Without wound	+ (100)	3	6

+ = Positive to the pathogenicity test./Positiva a la prueba de patogenicidad.

- = Negative to the pathogenicity test./Negativo a la prueba de patogenicidad.

Dpi = Days post-inoculation./Días post-inoculación.

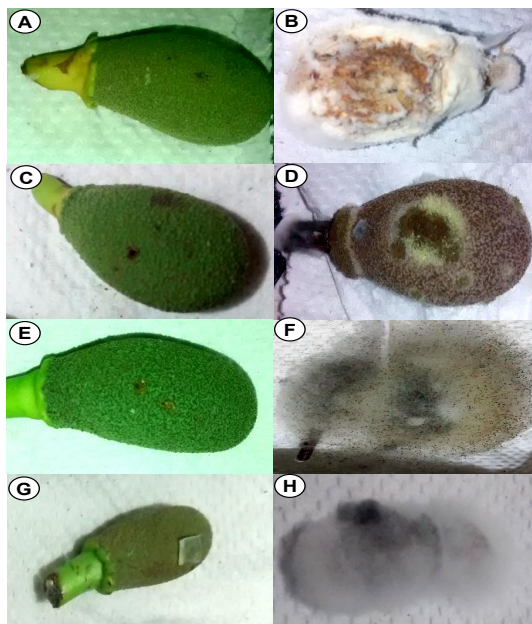


Figure 1. Symptoms of rot in female inflorescences of jackfruit. A) Control with wound, **B)** *Fusarium solani*, **C)** Control with wound, **D)** *Aspergillus flavus*, **E)** Control with wound, **F)** *Rhizopus stolonifer*, **G)** Control without wound (PDA without mycelium), **H)** *Lasiodiplodia theobromae*.

Figura 1. Síntomas de pudrición en inflorescencias femeninas de yaca. A) Testigo con herida, **B)** *Fusarium solani*, **C)** Testigo con herida, **D)** *Aspergillus flavus*, **E)** Testigo con herida, **F)** *Rhizopus stolonifer*, **G)** Testigo sin herida (PDA sin micelio), **H)** *Lasiodiplodia theobromae*.

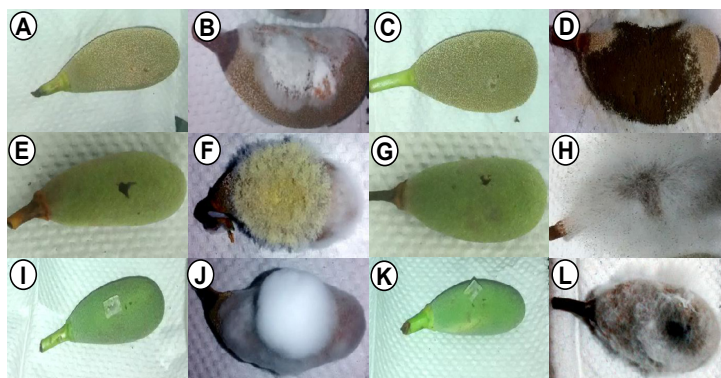


Figure 2. Symptoms of rot in male inflorescences in jackfruit. A) Control without wound, **B)** *Fusarium solani*, **C)** Control without wound, **D)** *Aspergillus niger*, **E)** Control with wound, **F)** *Aspergillus flavus*, **G)** Control with wound, **H)** *Rhizopus stolonifer*, **I)** Control without wound (PDA without mycelium), **J)** *Cunninghamella clavata*, **K)** Control with wound (PDA without mycelium), **L)** *Lasiodiplodia theobromae*.

Figura 2. Síntomas de pudrición en inflorescencias masculinas de yaca, A) Testigo sin herida, **B)** *Fusarium solani*, **C)** Testigo sin herida, **D)** *Aspergillus niger*, **E)** Testigo con herida, **F)** *Aspergillus flavus*, **G)** Testigo con herida, **H)** *Rhizopus stolonifer*, **I)** Testigo sin herida (PDA sin micelio), **J)** *Cunninghamella clavata*, **K)** Testigo con herida (PDA sin micelio), **L)** *Lasiodiplodia theobromae*.

The macro and microscopic characteristics of the pathogenic fungi to jackfruit inflorescences were the following: *Fusarium solani* showed an even and continuous growth, it developed a slight pink mycelium, conidia (fialospore), variable hyalines slightly curved with pointy ends, in a canoe-shape and, ovoid microconidia or individual oblongs (Figure 3A). *Aspergillus niger* presented black mycelium with abundant sporulation, while on the back appeared a yellowish white tone; long conidiophores, flat and phialides covering the vesicle completely (Figure 3B). *Aspergillus flavus* presented green-yellowish velvety mycelium with abundant sporulation, while on the back a brown-reddish color was observed, wrinkled conidiophores of variable length with phialides in the apex covering the vesicle entirely (Figure 3C). *Rhizopus stolonifer* presented a fast-growing colony with coenocytic, dense, aerial, and cottony with a white color at the beginning, and then it turned dark gray, sporangiospores without ramifying of a dark tone produced in stolons added to the substrate by means of the rhizoids and black spherical sporangia with columella (Figure 3D; Mass, 1998). *Cunninghamella clavata* presented a size-limited, white, pubescent-

presencia de micelio abundante (Serrato-Díaz *et al.*, 2013), mientras que en longan, las inflorescencias se momificaron (Serrato-Díaz *et al.*, 2014).

Las características macro y microscópicas de los hongos patogénicos a inflorescencias de yaca fueron las siguientes: *Fusarium solani* mostró un crecimiento uniforme y continuo, desarrolló un ligero micelio color rosa, conidios (fialosporas), hialinos variables, macroconidios ligeramente curvados con los extremos puntiagudos, en forma de canoa y, microconidios ovoides u oblongos individuales (Figura 3A). *Aspergillus niger* presentó micelio negro con abundante esporulación, mientras que al reverso apreció una coloración blanca amarillenta; conidióforos largos, lisos y fiálides que cubren completamente la vesícula (Figura 3B). *Aspergillus flavus* presentó micelio aterciopelado color amarillo verdoso con abundante esporulación, mientras que al reverso se observó un color marrón-rojizo, conidióforos largos, lisos y fiálides que cubren completamente la vesícula (Figura 3C). *Rhizopus stolonifer* presentó una colonia de rápido crecimiento con micelio cenocítico, denso, aéreo y algodonoso de color blanco al inicio, y después se tornó gris oscuro, esporangióforos sin ramificar de color oscuro producidos

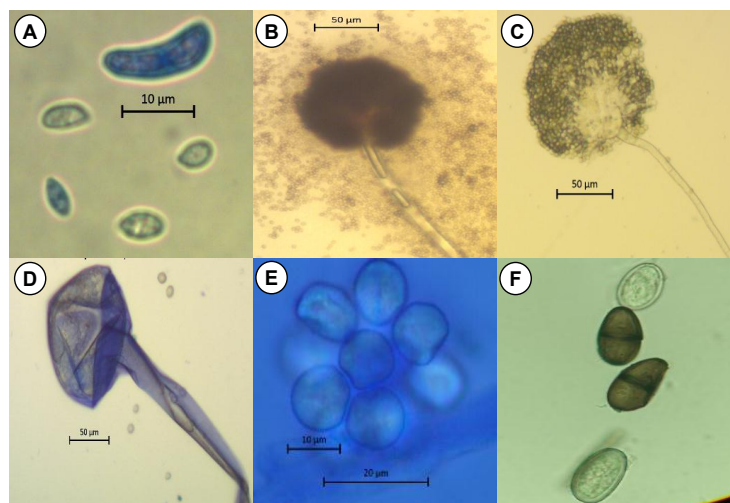


Figure 3. Microscopic morphological characters of the pathogenic fungi of jackfruit inflorescences in Nayarit, A) *Fusarium solani*, B) *Aspergillus niger*, C) *Aspergillus flavus*, D) *Rhizopus stolonifer*, E) *Cunninghamella clavata*, F) *Lasiodiplodia theobromae* (mature and immature conidia).

Figura 3. Caracteres morfológicos microscópicos de los hongos patógenos de inflorescencias de yaca en Nayarit, A) *Fusarium solani*, B) *Aspergillus niger*, C) *Aspergillus flavus*, D) *Rhizopus stolonifer*, E) *Cunninghamella clavata*, F) *Lasiodiplodia theobromae* (conidios maduros e inmaduros).

cottony, macrosiphoned, hyaline, coenocytic, ramified, colony with sporangia (uniesporado) and, round or ogival sporangiospores (Figure 3E). *Lasiodiplodia theobromae* presented an even growth, later turning dark gray and finally acquiring a black tone. Twenty days after incubation, it produces pycnidia conidiomata in stromas, semi-immersed and dispersed, from gray to black and pyriform. The unripe conidia did not present septum (amerspore), they were hyalines, cylindrical, and with a thick wall, while the ripe conidia presented one septum (didimospore), of a dark brown color and ellipsoidal ovoid with irregular longitudinal striations (Figure 3F). The morphological characteristics described by the pathogenic fungi to inflorescences of jackfruit in Nayarit, Mexico, agree with what Barnett & Hunter described (2006).

According to their morphological characteristics and genomic sequence compared to other sequences reported and recorded in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), the homology was obtained with: *Fusarium solani* 99 % (Acceso: KX379166.1), *Aspergillus niger* 99 % (Acceso: KY204007.1), *Aspergillus flavus* 96 % (Acceso: MF113270.1), *Rhizopus stolonifer* 92 % (Acceso: MF461022.1), *Cunninghamella clavata* 99 % (Acceso: JN205890.1) and *Lasiodiplodia theobromae* 99 % (KX462997.1).

Conclusion

Based on the molecular and morphological identification, aside from the pathogenicity tests, the fungi causing rot in female inflorescences of jack fruit in Nayarit, Mexico, were identified, which are: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer* and *Lasiodiplodia theobromae*; and in male inflorescences: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus niger* and *Cunninghamella clavata*; showing greater susceptibility to male inflorescences when these fungi attack. The aphid *Aphis (Toxoptera) aurantii* is a vector of *Rhizopus stolonifer* among the male inflorescences. This paper offers the first report of *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* and *Cunninghamella clavata* as pathogens of inflorescences of jackfruit.

en estolones adheridos al sustrato por medio de rizoides y esporangios esféricos negros con columella (Figura 3D; Mass, 1998). *Cunninghamella clavata* presentó una colonia de tamaño ilimitado, color blanco, vellosas-algodonosas, micelio macrosifonado, hialino, cenocítico, ramificado, con esporangios (uniesporados) y, esporangiosporas redondas u ovoides (Figura 3E). *Lasiodiplodia theobromae* presentó un crecimiento uniforme, continuo y con una ligera elevación, al inicio, el micelio fue de color blanco, posteriormente se tornó gris oscuro y finalmente adquirió un tono negro. A los 20 días de incubación, produjo conidiomata pycnidiales en estromas, semi-inmersos y dispersos, de color grisáceo a negro y piriformes. Los conidios inmaduros no presentaron septos (amersporas), fueron hialinos, cilíndricos y con pared gruesa, mientras que los conidios maduros presentaron un septo (didimosporas), color café oscuro y ovoides a elipsoidales con estriaciones longitudinales irregulares (Figura 3F). Las características morfológicas descritas para los hongos patógenos a inflorescencias de yaca en Nayarit, México, concuerdan con Barnett & Hunter (2006).

De acuerdo con sus caracteres morfológicos y secuencia genómica comparada con otras secuencias reportadas y registradas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), se obtuvo la homología con: *Fusarium solani* 99 % (Acceso: KX379166.1), *Aspergillus niger* 99 % (Acceso: KY204007.1), *Aspergillus flavus* 96 % (Acceso: MF113270.1), *Rhizopus stolonifer* 92 % (Acceso: MF461022.1), *Cunninghamella clavata* 99 % (Acceso: JN205890.1) y *Lasiodiplodia theobromae* 99 % (KX462997.1).

Conclusión

Con base en la identificación morfológica y molecular, además de las pruebas de patogenicidad, se identificó a los hongos que ocasionan la pudrición de inflorescencias femeninas de yaca en Nayarit, México, los cuales son: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer* y *Lasiodiplodia theobromae*; y en inflorescencias masculinas: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus niger* y *Cunninghamella clavata*; mostrando mayor susceptibilidad las inflorescencias masculinas al ataque de estos hongos. El áfido *Aphis (Toxoptera) aurantii* es vector de *Rhizopus stolonifer* entre las inflorescencias masculinas. Este estudio ofrece el primer reporte de *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* y *Cunninghamella clavata* como patógenos de inflorescencias de yaca.

References

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. New York. USA. 922p.
- Ahrens, U. & Seemüller, E. (1992). Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82(8): 828-832. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.pdf.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Molecular Biology*, 215(3): 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Alves, A. D. M., De Souza, C. A., De Oliveira, R. J., Cordeiro, T. R. and Santiago, A. L. D. A. (2017). *Cunninghamella clavata* from Brazil: a new record for the western hemisphere. *Mycotaxon*, 132(2): 381-389. <https://doi.org/10.5248/132.381>
- APAARI. (2012). Jackfruit Improvement in the Asia-Pacific Region – A Status Report. Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, Bangkok, Thailand. 182 p.
- Bamba, R. & Sumbali, G. (2005). Co-occurrence of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid in sour lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during post-harvest pathogenesis by *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 159(3): 407-411. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-8401-x>
- Barnett, L.H. & Hunter, B.B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Castroagudin, V. L., Correll, J. C. and Cartwright, R. D. (2009). First report of fruit rot of pumpkin caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in Arkansas. *Plant Disease*, 93(6): 669-669. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0669B>
- Crane, J.H. & Balerdi, C.F. (2000). La jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) en Florida. Departamento de Horticultural Sciences, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. (UF/IUFAS). Documento HS1038, consultado en 2016. 9 p.
- Fogliata, G. M., Martínez, C. V., Acosta, M. E., Muñoz, M. L. and Ploper, L. D. (2013). First Report of Fusarium Rot Caused by *Fusarium oxysporum* on Lemon in Tucumán, Argentina. *Plant Disease*, 97(7): 989-989. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0069-PDN>
- García-Jiménez, J., Armengol, J., Moya, M. J. and Sales Jr, R. (1997). First report of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 in Spain. *Plant Disease*, 81(10): 1216-1216. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1216A>
- Ghosh, G.H. (1994). Studies on flowering and prevalence of fruit drop in jackfruit. Annual Report (1993-94). Horticulture Research Center, BARI, Gazipur, Bangladesh, 4-9 pp.
- Ghosh, R., Barman, S., Mukhopadhyay, A. and Mandal, N. C. (2015). Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. *Biological control*, 83: 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.020>
- Haq, N. (2006) Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*, Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK. 192 p.
- Horn, B. W., Sorensen, R. B., Lamb, M. C., Sobolev, V. S., Olarte, R. A., Worthington, C. J. and Carbone, I. (2014). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia naturally produced in corn. *Phytopathology*, 104(1): 75-85. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-13-0129-R>
- Latorre, B. A., Viertel, S. C. and Spadaro, I. (2002). Severe outbreaks of bunch rots caused by *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* on table grapes in Chile. *Plant Disease*, 86(7): 815-815. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.815C>
- Liaquat, F., Arif, S., Ashraf, M., Chaudhary, H. J., Munis, M. F. H. and Farooq, A. B. U. (2016). *Aspergillus niger* causes fruit rot of lemon and grapefruit in Pakistan. *Plant Disease*, 100(9): 1951-1951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0199-PDN>
- Lin, C. P., Tsai, J. N., Ann, P. J., Chang, J. T. and Chen, P. R. (2017). First Report of Rhizopus Rot of Strawberry Fruit Caused by *Rhizopus stolonifer* in Taiwan. *Plant Disease*, 101(1): 254. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1033-PDN>.
- Luna, E. G., Alejo, S. C., Ramírez, G. L. G. and Arévalo, G. M. L. (2013). La yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) un fruto de exportación. *Agro Productividad*, 6(5): 65-70. <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/784>
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L. and Wang, T. C. (1995). Conidial germination and appressorial formation of *Collectotrichum*

- capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. *Plant Disease*, 79: 361-366. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9546350>
- Marino A., Nostro, A. and Fiorentino, C. (2009). Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3): 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.026>
- Mass, J. L. (1998). Compendium of strawberry diseases. Second edition. St. Paul. The American Phytopathological Society. 138 pp. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=81405>
- Nelson, S. (2005). *Rhizopus* rot of jackfruit. *Plant Disease*, PD-29. <https://www.growables.org/information/TropicalFruit/documents/JackfruitRot.pdf>
- Ni, H. F., Chen, R. S., Chang, S. F. and Yang, H. R. (2008). First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of jackfruit in Taiwan. *Plant Disease*, 92(7): 1137-1137. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1137A>
- Nieto-Angel, D., Lara-Viveros, F. M., Landero-Valenzuela, N., García-Velasco, R. and Reboucas, T. H. (2011). Effect glucorafano isolated of broccoli florets on the germination of *Rhizopus stolonifer* spores. *Phytopathology*, 101(6): S128-S128.
- Ochoa, J. L., Hernández-Montiel, L. G., Latisnere-Barragán, H., de La Luz, J. L. and Larralde-Corona, C. P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja citrus sinensis l. osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Cyta-Journal of Food*, 5(5): 352-359. <https://doi.org/10.1080/11358120709487712>
- Palumbo, J. D., Mahoney, N. E., Light, D. M., Siegel, J., Puckett, R. D. and Michailides, T. J. (2014). Spread of *Aspergillus flavus* by navel orangeworm (*Amyelois transitella*) on almond. *Plant Disease*, 98(9): 1194-1199. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-1015-RE>
- Patiño-Arellano, S. A., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., Lomelí-Flores, R. and Díaz-Gómez, O. (2012). Composición y fluctuación de áfidos vectores del virus de la tristeza de los cítricos en la Península de Yucatán, México. *Entomología Mexicana*, 11: 370-374.
- Pawar, N. V., Patil, V. B., Kamble, S. S. and Dixit, G. B. (2008). First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on Zingiber officinale from India. *Plant Disease*, 92(9): 1368-1368. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1368C>
- Pushpakumara, D. K. N. G. (2006). Foral and fruit morphology and phenology of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae). Sri. Lankan *Journal of Agricultural Science*, 43: 82-196. https://www.researchgate.net/profile/Dkng_gamini_Pushpakumara/publication/238953941_FORAL_AND_FRUIT_MORPHOLOGY_AND_PHENOLOGY_OF_ARTOCARPUS_HETEROPHYLLUS_LAM_MORACEAE/links/00b7d51bfd2617883b000000/FORAL-AND-FRUIT-MORPHOLOGY-AND-PHENOLOGY-OF-ARTOCARPUS-HETEROPHYLLUS-LAM-MORACEAE.pdf
- Ragazzo, S. J.A., Gutiérrez, E. A., Luna, S. G., Gómez, L. J. F. and Calderón S. M. (2011). Identificación molecular del hongo causante de la pudrición postcosecha de la jaca. *Revista Mexicana de Micología*, 34: 9-15. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802011000200003&script=sci_arttext&lng=en
- Rodríguez, Y., Mosqueda, M., Companioni, B., Arzola, M., Borrás, O., Pérez, M. C., Lorenzo, J. C. and Santos, R. (2002). Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to heart rot disease. *In vitro Cell. Developmental Biology-Plant*, 38: 613-616. <https://doi.org/10.1079/IVP2002346>
- Rodríguez-Palomera, M., Cambero-Campos, J., Luna-Esquivel, G., Robles-Bermúdez, A., and Cambero-Nava, K. G. (2017). Entomofauna asociada al cultivo de yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) en Nayarit, México. *Entomología mexicana*, 4: 220–225. https://socmexent.org/entomologia/revista/2017/EA/EM0122017_220-225.pdf
- Serrato-Díaz, L. M., Pérez-Cuevas, M., Rivera-Vargas, L. I. and French-Monar, R. D. (2013). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight of mango. *Plant Disease*, 97(10): 1380-1380. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0238-PDN>
- Serrato-Díaz, L. M., Rivera-Vargas, L. I., Goenaga, R., and French-Monar, R. D. (2014). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight and fruit rot of longan (*Dimocarpus longan* L.) in Puerto Rico. *Plant Disease*, 98(2): 279-279. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0473-PDN>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera) (2016). Cierre de la producción agrícola por cultivo. En línea. Consultado en octubre de 2016. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Setamou, M., Cardwell, K., Schulthess, F. and Hell, K. (1997). *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of preharvest maize in Benin. *Plant Disease*, 81(11): 1323-1327. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1323>
- Silva Vara, S., Peña del Río, M. D. L. A., Peña Martínez, R., Villegas Jiménez, N., Byerly Murphy, K. F. and Rocha Peña, M.

- A. (2001). Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia*, 35(4): 441-450. <https://www.redalyc.org/html/302/30235408/>
- Shiosaki, R. K., Okada, K., De Gusmão, N. B., Nigam, P., Falcão, P. S., Da Silva, N. H., and de Campos-Takaki, G. M. (2001). Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(3): 123-127.
- Thomidis, T. and Exadaktylou, E. (2012). First report of *Aspergillus niger* causing postharvest fruit rot of cherry in the prefectures of Imathia and Pella, Northern Greece. *Plant Disease*, 96(3): 458-458. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-11-0620>
- Utkhede, R. & Mathur, S. (2003). Fusarium fruit rot of greenhouse sweet peppers in Canada. *Plant Disease*, 87(1): 100-100. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.100C>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Snisky and T. White (eds). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press 315-322 pp.