

# ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Taphrina caerulescens* IN *Quercus eduardii* IN AGUASCALIENTES, MEXICO

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Taphrina caerulescens* EN *Quercus eduardii* EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

Gregg Evans<sup>1</sup>, Onesimo Moreno-Rico<sup>2\*</sup>, José J. Luna-Ruiz<sup>3</sup>, Joaquín Sosa-Ramírez<sup>3</sup>, Celeste E. Moreno-Manzano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ciencias Biológicas, Centro de Ciencias Básicas (CCB), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Avenida Universidad # 940, Colonia Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México (evans.gregg@gmail.com). <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, CCB, UAA, Avenida Universidad # 940, Ciudad Universitaria C.P. 20131, Aguascalientes, Aguascalientes, México (omoreno@correo.uaa.mx). <sup>3</sup>Departamento de Disciplinas Agrícolas, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA, Jesús María, Aguascalientes. (joselunarui11@yahoo.com.mx), (jsosar@correo.uaa.mx). <sup>4</sup>CBTA 61, Aquiles Elorduy García, Calvillo, Aguascalientes, México (celesmm@hotmail.com).

### ABSTRACT

*Taphrina caerulescens* exclusively affects plants of the *Quercus* genus. The identification and isolation of this fungus is difficult due to its dimorphic nature and extremely slow growth habit in artificial growth media. The objective of this research was to isolate and identify the fungal pathogen *T. caerulescens*. Three methods were used to isolate the fungus, however, only the spore fall method was successful. In order to identify the fungus, a visual inspection of the host plants infected leaves was carried out. The symptoms and signs of infection were noted. In addition to the typical blister formation on the infected leaves, an atypical symptom comprising of chlorotic spots covered with asci was also observed. Three biochemical tests were carried out to prove that the pathogen was in the genus *Taphrina*: The first, tested the ability to utilize urea, the second, its capacity to produce extra cellular DNase, and the third tested its reaction to Diazonium blue B (rapid blue salts). For species identification the following analyses were carried out: 1) carbon assimilation tests using the glucose, saccharose, D-xylose, raffinose, trehalose and sorbitol, as carbon sources; 2) molecular analysis tools were utilized to extract and sequence the genomic DNA. The resulting sequences when analysed with the NCBI Nucleotide blast tool confirmed, with 99% similitude, that the isolate was similar in nature to *T. caerulescens* strain CBS 351.35 ascension number AF492081.1. Pathogenicity test was also carried out and resulted in the infection of 25 % of the inoculated plants.

### RESUMEN

*Taphrina caerulescens* afecta exclusivamente a las plantas del género *Quercus*. La identificación y el aislamiento de este hongo es difícil debido a su naturaleza dimórfica y su hábito de crecimiento extremadamente lento en los medios de crecimiento artificial. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar el patógeno fúngico *T. caerulescens*. Tres métodos se usaron para aislar el hongo; sin embargo, solo el método de caída de esporas fue exitoso. Para identificar el hongo, se efectuó una inspección visual de las hojas infectadas de las plantas huésped y se observaron los síntomas y signos de infección. Además de la formación típica de ampollas en las hojas infectadas, también se observó un síntoma atípico que comprende manchas cloróticas cubiertas con asci. Tres pruebas bioquímicas se realizaron para demostrar que el patógeno pertenecía al género *Taphrina*: la primera, probó la capacidad de utilizar urea, la segunda, su capacidad de producir DNasa extracelular, y la tercera probó su reacción al azul de diazonio B (sales azules rápidas). Para identificar las especies se efectuaron los siguientes análisis: 1) pruebas de asimilación de carbono usando la glucosa, sacarosa, D-xilosa, rafinosa, trehalosa y sorbitol, como fuentes de carbono; 2) se utilizaron herramientas de análisis molecular para extraer y secuenciar el ADN genómico. Cuando las secuencias resultantes se analizaron con la herramienta de explosión de nucleótidos NCBI se confirmó, con una similitud del 99%, que el aislamiento era de naturaleza similar a la cepa *T. caerulescens* CBS 351.35 con número de ascensión AF492081.1. También se realizó una prueba de patogenicidad que resultó en la infección del 25% de las plantas inoculadas.

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: April, 2018. Approved: August, 2018.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 781-795. 2019.

**Key words:** Aguascalientes PAs, oak populations, *Quercus eduardii*, pathogenicity, leaf blisters, *Taphrina caerulescens*.

## INTRODUCTION

**T***aphrina caerulescens* belongs to the order Taphrinales. The first complete monograph of the genus was realized by Mix (1949) who divided the genus into 100 species, and *Taphrina* spp. are dimorphic (Mix, 1949; Kramer, 1960). Dimorphic fungi are those fungi that exist either in yeast form or as mold (mycelial form) depending on environmental conditions, physiological conditions of the fungus or the genetic characteristics (Flannigan *et al.*, 2001). When the fungus is within its host tissue, it is present in its filamentous state; however, under adverse conditions it is present in its yeast state and in this state the fungus behaves like a saprophyte. *Taphrina* spp. were identified based upon geographical distribution, site and type of the infection and symptoms, localization of mycelium, morphology of the fungal structures and host range (Mix, 1949; Taylor and Birdwell, 2000; Rodríguez and Fonseca, 2003). In order to identify *Taphrina* spp. molecular methods were used by Sjamsuridzal *et al.* (1997), Rodríguez and Fonseca (2003), Bacigálová *et al.* (2003), Tavares *et al.* (2004), Petrydesová *et al.* (2013), Isheng *et al.* (2014) and Selbmann *et al.* (2014). The most important species include: *T. deformans* causes deformation of leaves, fruits and flowers and the defoliation of *Prunus persica* and *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb; *T. communis* causes deformations in American plum (*Prunus americana*); *T. pruni* affects European plum species; *T. wiesneri* (Rathay) Mix, syn. *T. cerasi* (Fuckel) Sadeb (Farr *et al.*, 1989) produces leaf blisters and witches broom in all cherry species; *T. armeniaca* (Georgescu y Badea) causes witches broom in apricot (*Prunus armeniaca*); *T. confusa* (Atk.) Giesen in *Prunus virginiana*; *T. farlowii* Sadeb causes blistering of the leaves of various shrubs and hedges, including *Prunus serotina*. *Taphrina caerulescens* causes leaf blister and deformation in approximately 50 species of oak (*Quercus*); *Q. acutissima* (Carruth), *Q. agrifolia* (Nee) *Q. alba* (L.), *Q. borealis* (Michx), *Q. cerris* (L), *Q. cinerea* (Michx), *Q. coccijera* (L), *Q. coccinea* (Muench), *Q. crispula* (Blume), *Q. dentata* (Thunb), *Q. douglasii* (Hook), *Q. ellipsoidalis* (Hill) , *Q. jruticosa* (Brot), *Q. gambelii* (Nutt), *Q. geminala*

**Palabras clave:** PAs de Aguascalientes, poblaciones de roble, *Quercus eduardii*, patogenicidad, ampollas de hoja, *Taphrina caerulescens*.

## INTRODUCCIÓN

**T***aphrina caerulescens* pertenece al orden Taphrinales. La primera monografía completa del género fue realizada por Mix (1949), que dividió el género en 100 especies y las especies de *Taphrina* son dimorfas (Mix, 1949; Kramer, 1960). Los hongos dimórficos son aquellos hongos que existen en forma de levadura o como moho (forma micelial) según las condiciones ambientales, las condiciones fisiológicas del hongo o las características genéticas (Flannigan *et al.*, 2001). Cuando el hongo está dentro de su tejido huésped, se presenta en su estado filamentoso; sin embargo, en condiciones adversas, también se presenta en su estado de levadura y en este estado el hongo se comporta como un saprófito. Las especies de *Taphrina* se identificaron con base a la distribución geográfica, el sitio, el tipo de infección, los síntomas, la localización del micelio, la morfología de las estructuras fúngicas y el rango del huésped (Mix, 1949; Taylor y Birdwell, 2000; Rodríguez y Fonseca, 2003). Métodos moleculares se usaron por Sjamsuridzal *et al.* (1997), Rodríguez y Fonseca (2003), Bacigálová *et al.* (2003), Tavares *et al.* (2004), Petrydesová *et al.* (2013), Isheng *et al.* (2014) y Selbmann *et al.* (2014) para identificar especies de *Taphrina*. Las especies más importantes incluyen: *T. deformans*, que causa deformación de hojas, frutos y flores y la defoliación de *Prunus persica* y *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb; *T. communis*, causa deformaciones en la ciruela americana (*Prunus americana*); *T. pruni*, afecta a las especies de ciruela europeas; *T. wiesneri* (Rathay) Mix, syn. *T. cerasi* (Fuckel) Sadeb (Farr *et al.*, 1989) produce ampollas en las hojas y enfermedad de escoba de bruja en todas las especies de cerezas; *T. armeniaca* (Georgescu y Badea) causa de escoba de bruja en el albaricoque (*Prunus armeniaca*); *T. confusa* (Atk.), causa escoba de bruja en *Prunus virginiana*; *T. farlowii* Sadeb, causa ampollas en las hojas de varios arbustos y setos, incluyendo *Prunus serotina*.

*Taphrina caerulescens* causa ampollas en las hojas y deformación en aproximadamente 50 especies de roble (*Quercus*): *Q. acutissima* (Carruth), *Q. agrifolia* (Nee) *Q. alba* (L.), *Q. borealis* (Michx), *Q. cerris*

(Small), *Q. georgiana* (Curtis), *Q. ilicifolia* (Wangh), *Q. imbricaria* (Michx), *Q. kelloggii* (Newb), *Q. laurifolia* (Michx), *Q. lobata* (Nee), *Q. macrocarpa* (Michx), *Q. marilandica* (Muench), *Q. maxima* (Ashe), *Q. mirbeckii* (Dur), *Q. mongolica* (Turcz), *Q. nigra* (L), *Q. palustris* (Moench), *Q. phellos* (L), *Q. prinoides* (L), *Q. pubescens* (Willd), *Q. lanuginose*, *Q. rubra* (L), *Q. robur*, *Q. serrata* Thunb), *Q. sessiliflora* (Salisb), *Q. stellata* (Wangh), *Q. undulata* (Torr), *Q. utahensis* (Rydb), *Q. velutina* (Lam), *Q. virginiana* (Mill), *Q. eduardii* and *Q. potosina* (Mix, 1949; Moreno *et al.*, 2015).

The presence of this pathogen was confirmed in Mexico based upon the description of symptoms, signs and host range (Moreno *et al.*, 2015). Up until now the pathogen was thought to be affecting *Quercus* spp. solely in Asia, Europe and North America (USDA, 2017).

The objective of this study was to isolate and identify the pathogen *T. caerulescens* and to confirm its presence in Aguascalientes, Mexico, using visual symptoms, morphology, biochemical and molecular techniques.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Leaf samples of *Q. eduardii* with and without symptoms of the disease were collected in the Sierra Fria of Aguascalientes during July to August of 2015 to 2017. The locations of sample collection were as follows: 22° 11' 3" N | 102° 36' 12" W; 22° 11' 19" N | 102° 36' 29" W; 22° 11' 31" N | 102° 36' 50" W; 22° 11' 51" N | 102° 37' 46" W; 22° 10' 52" N | 102° 38' 35" W and 22° 6' 11" N | 102° 41' 39" W (Figure 1). Samples were placed in clear polyethylene bags containing a moist tissue and then placed in a cooler for no more than 24 h. They were later processed in the Plant Pathology Laboratory of the Autonomous University of Aguascalientes in Aguascalientes.

### Isolation and identification of *T. caerulescens*

#### Description of symptoms

Visual symptoms of infected leaves were described and compared to reports of Mix (1949), Taylor and Birdwell (2000) and Bacigálová (2010).

(L), *Q. cinerea* (Michx), *Q. coccijera* (L), *Q. coccinea* (Muench), *Q. crispula* (Blume), *Q. dentata* (Thunb), *Q. douglasii* (Hook), *Q. ellipsoidal* (Hill), *Q. jruti-cosa* (Brot), *Q. gambelii* (Nutt), *Q. geminala* (Small), *Q. georgiana* (Curtis), *Q. ilicifolia* (Wangh), *Q. imbricaria* (Michx), *Q. kelloggii* (Newb), *Q. laurifolia* (Michx), *Q. lobata* (Nee), *Q. macrocarpa* (Michx), *Q. marilandica* (Muench), *Q. maxima* (Ashe), *Q. mirbeckii* (Dur), *Q. mongolica* (Turcz), *Q. nigra* (L), *Q. palustris* (Moench), *Q. phellos* (L), *Q. prinoides* (L), *Q. pubescens* (Willd), *Q. lanuginose*, *Q. rubra* (L), *Q. robur*, *Q. serrata* Thunb), *Q. sessiliflora* (Salisb), *Q. stellata* (Wangh), *Q. undulata* (Torr), *Q. utahensis* (Rydb), *Q. velutina* (Lam), *Q. virginiana* (Mill), *Q. eduardii* y *Q. potosina* (Mix, 1949; Moreno *et al.*, 2015).

La presencia de este patógeno se confirmó en México con base en la descripción de los síntomas, los signos y el rango del huésped (Moreno *et al.*, 2015). Hasta ahora se pensaba que el patógeno estaba afectando a la especie *Quercus* únicamente en Asia, Europa y América del Norte (USDA, 2017).

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar el patógeno *T. caerulescens* y confirmar su presencia en Aguascalientes, México utilizando síntomas visuales, morfología y técnicas bioquímicas y moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Las muestras de hojas de *Q. eduardii* con y sin síntomas de la enfermedad se recolectaron en la Sierra Fría de Aguascalientes durante julio a agosto de 2015 a 2017. Las ubicaciones de la recolección de muestras fueron las siguientes: 22° 11' 3" N | 102° 36' 12" O; 22° 11' 19" N | 102° 36' 29" O; 22° 11' 31" N | 102° 36' 50" O; 22° 11' 51" N | 102° 37' 46" O; 22° 10' 52" N | 102° 38' 35" O y 22° 6' 11" N | 102° 41' 39" O (Figura 1). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno transparente que contenían un tejido húmedo y luego se colocaron en un refrigerador durante no más de 24 h. Luego fueron procesados en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes en Aguascalientes.

### Aislamiento e identificación de *T. caerulescens*

#### Descripción de los síntomas

Los síntomas visuales de las hojas infectadas se describieron y compararon con reportes de Mix (1949), Taylor y Birdwell (2000) y Bacigálová (2010).



**Figure 1.** Map displaying locations in the Sierra Fria of Aguascalientes, Mexico, where samples were taken.  
**Figura 1.** Mapa que señala las ubicaciones en la Sierra Fria de Aguascalientes, Mexico, donde se tomaron las muestras.

### Isolation of *T. caerulecens*

Three methods were used to isolate the fungus, Method 1. The blastospores were obtained by leaf washing, a leaf sample (500 cm<sup>2</sup> of leaf) was shaken for 1 h with 500 mL of sterile distilled water containing one drop of Tween 80. One drop of the resulting suspension was plated on PDA media and using sterile inoculation loop it was spread evenly over the surface (Diem, 1974; Quintana-Obregón *et al.*, 2013). Method 2. Sections of approximately 5 mm<sup>2</sup> were cut from freshly collected infected *Q. eduardii* leaves with symptoms of the disease. Leaf pieces were cut from the outer limit of the advancing lesions, they were disinfested in 1% sodium hypochlorite for 1 min, washed with sterile distilled water and then placed in PDA and incubated at 20 °C for 14 d (Agrios, 2005). Method 3. The blastospore fall method. Leaf tissue of *Q. eduardii* bearing asci of *T. caerulecens* was fastened to Petri dish lids over PDA (Taylor and Birdwell, 2000; Bacigálová *et al.*, 2003).

### Maintenance of isolates

After the fungus was isolated from the host, the isolates were antiseptically purified and grown at 20 °C for 2 weeks. The purified fungal colonies were maintained on Yeast Malt Extract Agar (YMEA) (malt extract 3.0 g, dextrose 10.0 g, yeast extract 3.0 g, peptone 5.0 g, agar 20.0 g, distilled water 1000.0 mL, final pH 6.2) and PDA (Yarrow, 1998). They were then stored at 4 °C and sub cultured once a month. Observations were made using a Leica DME, and Carls Zeiss microscopes and documented using the Nikon D3000 and D5100 DCLR cameras.

### Aislamiento de *T. caerulecens*

Tres métodos se usaron para aislar el hongo. Método 1. Las blastosporas se obtuvieron mediante lavado de hojas, se agitó una muestra de hojas (500 cm<sup>2</sup> de hoja) durante 1 h con 500 ml de agua destilada estéril que contenía una gota de Tween 80. Una gota de la suspensión resultante se colocó en medios PDA y se extendió uniformemente sobre la superficie usando un asa de inoculación estéril (Diem, 1974; Quintana-Obregón *et al.*, 2013). Método 2. Secciones de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> se cortaron de hojas de *Q. eduardii* recién recolectadas con síntomas de la enfermedad. Los trozos de hojas se cortaron del límite exterior de las lesiones con avance, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, se lavaron con agua destilada estéril y luego se colocaron en PDA y se incubaron a 20 °C durante 14 d (Agrios, 2005); Método 3. El método de caída de blastosporas. El tejido de la hoja de *Q. eduardii* que porta asci de *T. caerulecens* se fijó a las tapas de las placas de Petri a través de PDA (Taylor y Birdwell, 2000; Bacigálová *et al.*, 2003).

### Mantenimiento de aislamientos

Después de aislar el hongo del huésped, los aislamientos se purificaron antisépticamente y se cultivaron a 20 °C por 2 semanas. Las colonias fúngicas purificadas se mantuvieron en agar de extracto de malta de levadura (YMEA) (3.0 g de extracto de malta, 10.0 g de dextrosa, 3.0 g de extracto de levadura, 5.0 g de peptona, 20.0 g de agar, 1000.0 mL de agua destilada, pH final 6.2) y PDA (Yarrow, 1998). Luego se almacenaron a 4 °C y se subcultivaron una vez al mes. Las observaciones se realizaron con

### Biochemical differentiation of *Taphrina* spp. from other yeast genus

In order to ensure that the isolates obtained from *Q. eduardii* leaves were *Taphrina* spp., they were subjected to a series of biochemical tests designed to differentiate *Taphrina* spp. from other yeast genus. The tests performed were the following: 1) Diazonium blue B (DBB) reaction. The DBB reagent was prepared by adding 15 mL of cold 0.25 M TRIS buffer (pH 7.0) to 15 mg of DBB technical grade; 95% pure; Sigma Chemical Co. The dissolved reagent was maintained in an ice bath and was used within 30 min. 2) Test for extracellular DNase activity. Tryptone 15 g, soy peptone 5 g, DNA 2 g, sodium chloride 5 g, methyl green 0.05 g, agar 15 g, sterile distilled water 1 L, final pH 7.3±0.2. 3) Tests for urease activity. Urea 20 g, sodium chloride 5 g, monopotassium phosphate 2 g, peptone 1 g, dextrose 1 g, phenol red 0.012 g, agar 15 g, sterile distilled water 1 L, final pH 6.7±0.2. All members of the genus *Taphrina* should produce a negative DBB reaction, negative extracellular DNase activity and positive urease activity (Seeliger, 1956; Van der Walt and Hopsu-Havu, 1976; Sen and Komagata, 1979; Hagler and Ahearn, 1981; Nagao and Katumoto, 1998; Prillinger *et al.*, 1990; Rodrigues and Fonseca, 2003).

### Assimilation of carbon sources to identify the species of *Taphrina* spp.

A modified version of carbon assimilation tests by Kali *et al.* (2015) was used to confirm the organism's identity. A 10 mL suspension with a density of  $3 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup> blastospores of *T. caerulescens* was prepared and stored at 4 °C for 24 h. This was done to starve and improve its utilization of the test sugars (Yarrow, 1998). For the negative control a solution of sterile distilled water and phenol red indicator without the addition of test sugars was used. In some of these experiments, glucose was considered a positive control.

Sugar solutions of 2% were prepared using each of the test sugars (glucose, saccharose, trehalosa, sorbitol, raffinose and D-xylose). Phenol red indicator (0.012 gm L<sup>-1</sup> sterile distilled water) was added to each test sugar. All reagents were carefully mixed ensuring that the pH was between 6.8 and 7. The sugar solutions, as well as the negative control, were prepared under sterile conditions.

From each sugar solution 150 µL were pipetted into Eppendorf tubes. The samples were sealed and stored at 4 °C for 24 h. After a 24 h time lapse, 100 µ L of the yeast suspension were added to the sugar solutions and incubated at 25 °C for 7 d. Tests were replicated 3 times (Yarrow, 1998).

los microscopios Leica DME y Carls Zeiss, y se documentaron con cámaras Nikon D3000 y D5100 DCLR.

### Diferenciación bioquímica de especie *Taphrina* de otros géneros de levadura

Para asegurar que los aislamientos obtenidos de las hojas de *Q. eduardii* pertenecieran a la especie *Taphrina*, se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas diseñadas para diferenciar la especie *Taphrina* de otro género de levadura. Las pruebas realizadas fueron las siguientes: 1) Reacción al azul de diazonio B (DBB). El reactivo DBB se preparó agregando 15 mL de tampón frío TRIS 0.25 M (pH 7.0) a 15 mg de grado técnico de DBB; 95% puro; Sigma Chemical Co. El reactivo disuelto se mantuvo en un baño de hielo y se usó dentro de 30 min. 2) Prueba de actividad de ADNasa extracelular. 15 g de triptona, 5 g de peptona de soja, 2 g de ADN, 5 g de cloruro de sodio, 0.05 g de verde de metilo, 15 g de agar, 1 L de agua destilada estéril, pH final de 7.3±0.2. 3) Pruebas de actividad de la ureasa. 20 g de urea, 5 g de cloruro de sodio, 2 g de fosfato monopotásico, 1 g de peptona, 1 g de dextrosa, 0.012 g de rojo de fenol, 15 g de agar, 1 L de agua destilada estéril, pH final 6.7±0.2. Todos los miembros del género *Taphrina* deben producir una reacción negativa de DBB, una actividad de ADNasa extracelular negativa y una actividad de ureasa positiva (Seeliger, 1956; Van der Walt y Hopsu-Havu, 1976; Sen y Komagata, 1979; Hagler y Ahearn, 1981; Nagao y Katumoto, 1998; Prillinger *et al.*, 1990; Rodríguez y Fonseca, 2003).

### Asimilación de fuentes de carbón para identificar las especies de *Taphrina*

Una versión modificada de las pruebas de asimilación de carbono de Kali *et al.* (2015) se usó para confirmar la identidad del organismo. Una suspensión de 10 ml con una densidad de  $3 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup> de blastosporas de *T. caerulescens* se preparó y se almacenó a 4 °C por 24 h. Esto se hizo para hambrearlo y mejorar su utilización de los azúcares de prueba (Yarrow, 1998). Para el testigo negativo se utilizó una solución de agua destilada estéril y un indicador de rojo de fenol sin la adición de azúcares de prueba. En algunos de estos experimentos, la glucosa se consideró un testigo positivo.

Soluciones de azúcar al 2% se prepararon usando cada uno de los azúcares de prueba (glucosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol, rafinosa y D-xilosa). Un indicador de rojo de fenol (0.012 gm L<sup>-1</sup> de agua destilada estéril) se añadió a cada azúcar de prueba. Todos los reactivos se mezclaron con cuidado, asegurando que el pH estuviera entre 6, 8 y 7. Las soluciones de azúcar, así como el testigo negativo, se prepararon en condiciones estériles.

### DNA isolation from pure cultures of *Taphrina* spp.

The fungal DNA was isolated from pure culture colonies grown for 14 d at 24 °C. One loopful of the cells grown on PDA was suspended in 1.5 mL of sterile distilled water and was pelleted in a centrifuge at 20 000 × *g* for 5 min. The supernatant was eliminated and a modification of 'Bust and Grab' protocol (Harju *et al.*, 2004) was used to obtain the fungal genomic DNA. The DNA quantity was estimated using the Nanodrop ND - 1000 spectrophotometer (Thermo scientific) and the quality was determined after being mounted in 1% agarose gels stained with redsafe dye and ran at 75 V for 48 min and viewed using the ChemiDoc XRS+System. Samples were run in duplicate in separate reactions.

### DNA isolation from *Quercus eduardii* leaves infected with *Taphrina* spp.

A modified CTAB and PVP extraction method was used to extract the genomic DNA from the leaves of *Q. eduardii* (Porebski *et al.*, 1997; Lian *et al.*, 2001; Shiran, *et al.*, 2004; Toader *et al.*, 2009; Azmat *et al.*, 2012). DNA yield and purity were determined by Nanodrop ND - 1000 spectrophotometer (Thermo scientific) and the quality was determined after being mounted in 1% agarose gels stained with redsafe dye and ran at 75 V for 48 min. Samples were run in duplicate in separate reactions.

### PCR analyses

PCR reactions were conducted in 50  $\mu$ L reaction volumes. Each reaction tube contained approximately 2  $\mu$ L of 20-ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> DNA template. The master mix High-Fidelity 2X (New England Biolabs Ltd.) was used according to the manufacturer's instructions. Following White *et al.* (1990), the ribosomal internal transcribed spacer region was amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 primers. The samples tested were the following: negative control (sterilized distilled water), pure fungal genomic DNA and genomic DNA extracted from leaves with blisters. The thermal cycling parameters were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min followed by 35 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 0.3 min, annealing at 65 °C for 0.3 min, and extension at 72 °C for 1 min. A final extension at 72 °C for 5 min was done at the end of the amplification. The resulting PCR products were analysed through electrophoresis and then viewed using the ChemiDoc XRS+System. The products of the PCR reactions were submitted for sequencing to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre.

De cada solución de azúcar se pipetearon 150  $\mu$ L en tubos Eppendorf. Las muestras se sellaron y almacenaron a 4 °C durante 24 h. Después de un lapso de tiempo de 24 h, se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión de levadura a las soluciones de azúcar y se incubaron a 25 °C durante 7 d. Las pruebas se repitieron tres veces (Yarrow, 1998).

### Aislamiento de ADN a partir de cultivos puros de la especie *Taphrina*

El ADN fúngico se aisló de colonias de cultivo puro cultivadas por 14 d a 24 °C. Un asa de células cultivadas en PDA se suspendió en 1.5 mL de agua destilada estéril y se sedimentó en una centrífuga a 20 000 × *g* durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se usó una modificación del protocolo "Bust and Grab" (Harju *et al.*, 2004) para obtener el ADN genómico de los hongos. La cantidad de ADN se estimó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND - 1000 (Thermo scientific) y la calidad se determinó después de incorporarlo en geles de agarosa al 1% teñidos con tinte Redsafe y corrido a 75 V durante 48 min y chequeado con el sistema ChemiDoc XRS+. Las muestras se corrieron por duplicado en reacciones separadas.

### Aislamiento de ADN de las hojas de *Quercus eduardii* infectadas con *Taphrina* spp.

Un método de extracción de CTAB y PVP modificado se usó para extraer el ADN genómico de las hojas de *Q. eduardii* (Porebski *et al.*, 1997; Lian *et al.*, 2001; Shiran, *et al.*, 2004; Toader *et al.*, 2009; Azmat *et al.*, 2012). El rendimiento y la pureza del ADN se determinaron con el espectrofotómetro Nanodrop ND - 1000 (Thermo scientific) y la calidad se determinó después de incorporarlo en geles de agarosa al 1% teñidos con tinte Redsafe y corrido a 75 V durante 48 min. Las muestras se corrieron por duplicado en reacciones separadas.

### Análisis de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 50  $\mu$ L. Cada tubo de reacción contenía aproximadamente 2  $\mu$ L de un molde de ADN de 20 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>. La mezcla maestra High-Fidelity 2X (New England Biolabs Ltd.) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De acuerdo con White *et al.* (1990), la región espaciadora transcrita interna ribosómica se amplificó y secuenció usando los iniciadores ITS1 e ITS4. Las muestras analizadas fueron las siguientes: negativo (agua destilada esterilizada), ADN genómico fúngico puro y ADN genómico extraído de las hojas con ampollas. Los parámetros del ciclo

### Pathogenicity test

Pathogenicity of *T. caerulescens* isolated from oak leaves of *Q. eduardii* was determined using cultured cells from a 2-week-old isolate, approximately  $1.35 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> were suspended in 0.01% Tween 80 and atomized onto the lower surfaces of leaves newly emerged from buds on 12 one-year-old greenhouse grown oak seedlings (Birdwell, 1996; Taylor and Birdwell, 2000). Inoculated seedlings were kept in growth and maintained under lab conditions of 22 °C and relative humidity of 100%. The inoculated plants were exposed to 12 h of light and 12 h of darkness. The plants were monitored weekly until the appearance of the disease symptoms.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Description of symptoms

The appearance of the disease symptoms is directly related the rainfall. The first symptoms of the disease on the leaves of *Q. eduardii* appear two to three weeks after the beginning of the season rains in Aguascalientes. Most of the blisters appeared on the adaxial surface of the leaf (Figures 2A, 2B, 2E, 2F); however, blisters were also observed on the abaxial surface of *Q. eduardii*. These blisters reached a height of up to 0.5 cm. In some cases, the leaves did not form blisters but rather formed chlorotic lesions with irregular borders (Figures 2C, 2D). Both types of symptoms varied from a few millimetres to more than 4 cm in diameter. The lower side of the leaf corresponding to the blisters was light green in colour. In most of the leaves with blister symptoms, no *asci* were observed on the adaxial surface of the blister; however, *asci* were observed on the adaxial surface of leaves which had the atypical symptoms (chlorotic spots). The *asci* on the leaf surfaces with the atypical symptoms were initially white to cream in appearance (Figure 2D). By the end of the third week they had turned grey or brown (Figure 2C). On some samples, *asci* formed on both surfaces of the leaf. In most cases, however, more *asci* were observed on the adaxial leaf surface. In leaves heavily infected, chlorotic spots or blisters joined and covered large areas of the leaf surface.

### Isolation and identification of *Taphrina* sp.

Of the three methods used to isolate pathogen only the blastospore fall method was successful.

térmico fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos que consisten en desnaturalización a 94 °C durante 0.3 min, recocido a 65 °C durante 0.3 min y con extensión a 72 °C durante 1 min. Una extensión final a 72 °C por 5 min se realizó al final de la amplificación. Los productos de PCR resultantes se analizaron mediante electroforesis y luego se visualizaron utilizando el sistema ChemiDoc XRS + System. Los productos de las reacciones de PCR se enviaron para su secuenciación a la Universidad McGill y al Centro de Innovación Génome Québec.

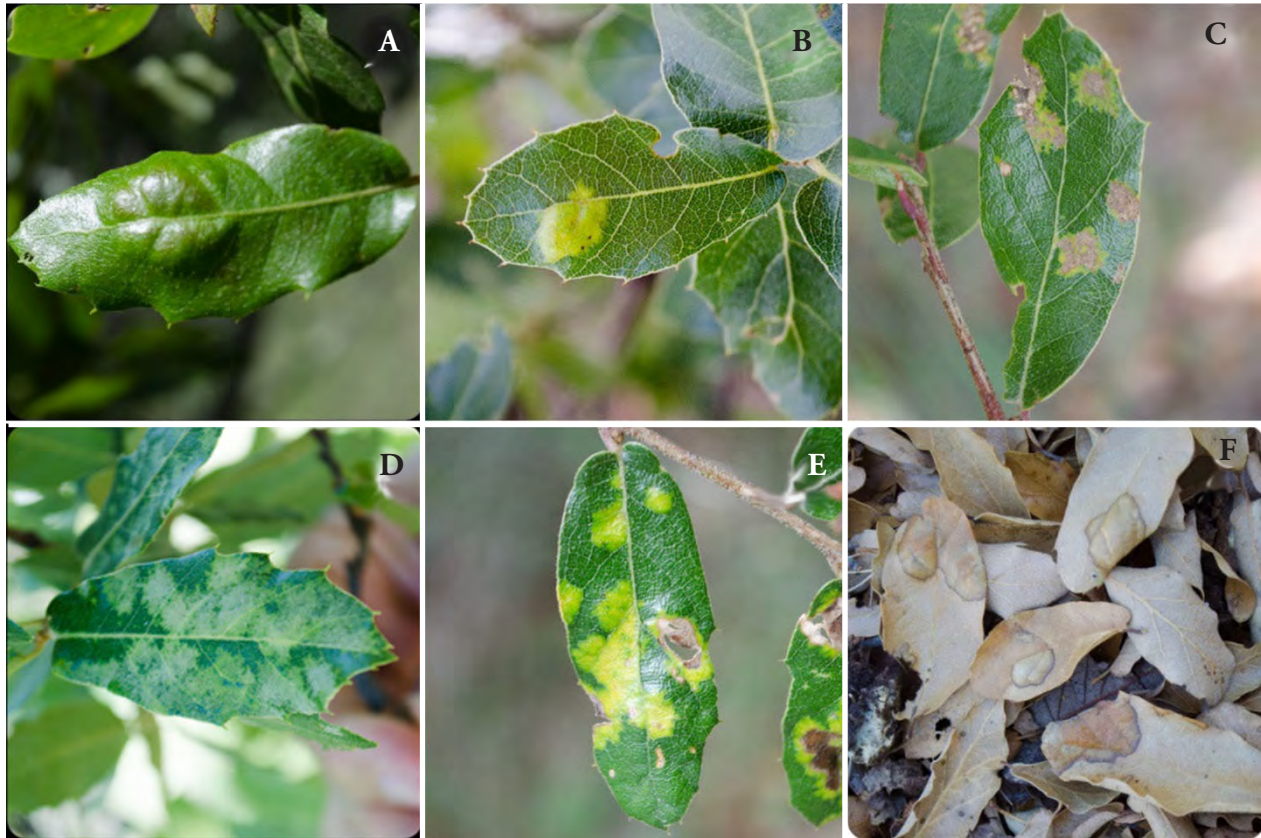
### Prueba de patogenicidad

La patogenicidad de *T. caerulescens* aislada de hojas de roble de *Q. eduardii* se determinó utilizando células cultivadas de un aislado de 2 semanas de edad, células de aproximadamente  $1.35 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup> se suspendieron en Tween 80 al 0.01% y se atomizaron en las superficies inferiores de hojas de brote reciente en 12 plántulas de roble de un año de edad cultivadas en invernadero (Birdwell, 1996; Taylor y Birdwell, 2000). Las plántulas inoculadas se mantuvieron en crecimiento y se mantuvieron en condiciones de laboratorio a 22 °C y a una humedad relativa del 100%. Las plantas inoculadas fueron expuestas a 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las plantas se monitorearon cada semana hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Descripción de los síntomas

La aparición de los síntomas de la enfermedad está directamente relacionada con la lluvia. Los primeros síntomas de la enfermedad en las hojas de *Q. eduardii* aparecen dos o tres semanas después del comienzo de la temporada de lluvias en Aguascalientes. La mayoría de las ampollas aparecieron en la superficie adaxial de la hoja (Figuras 2A, 2B, 2E, 2F); sin embargo, también se observaron ampollas en la superficie abaxial de *Q. eduardii*. Estas ampollas alcanzaron una altura de hasta 0.5 cm. En algunos casos, las hojas no formaron ampollas, sino que formaron lesiones cloróticas con bordes irregulares (Figuras 2C, 2D). Ambos tipos de síntomas variaron desde unos pocos milímetros hasta más de 4 cm de diámetro. El lado inferior de la hoja correspondiente a las ampollas era de color verde claro. En la mayoría de las hojas con síntomas de ampolla no se observaron *asci* en la superficie adaxial de la ampolla; sin embargo, se observaron *asci* en la superficie adaxial de las hojas que presentaban síntomas atípicos (manchas cloróticas).



**Figure 2.** Symptoms of *T. caerulea* on oak *Q. eduardii* leaves: A), B), and E) typical symptoms of leaf blister; C) and D) atypical symptoms; F) typical symptoms on dried leaves on forest floor.

**Figure 2.** Síntomas de *T. caerulea* en hojas de roble *Q. eduardii*: A), B), y E) síntomas típicos de ampolla de hoja; C) y D) síntomas atípicos; F) síntomas típicos en hojas secas de suelo forestal.

Spores were discharged onto the agar within 24 h and isolated colonies (blastospores originating from single asci) that formed were transferred to fresh media and incubated at 20 °C (Figure 3A). One isolate was purified and maintained from each sampling site. The mature colonies were light pink to cream in colour and with smooth convex surfaces with continuous borders (Figure 3B). This description fits the characteristics of *T. caerulea* (Mix, 1949; Taylor and Birdwell, 2000; Bacigálová *et al.*, 2003; Selbmann *et al.*, 2014).

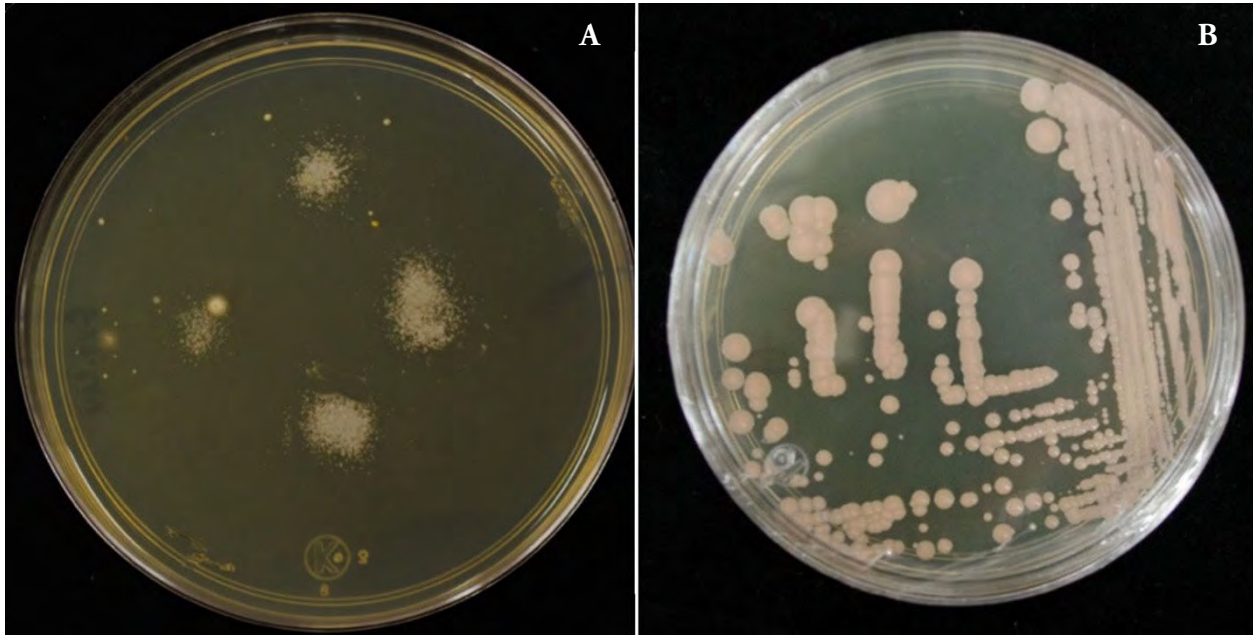
### Description of asci

The asci were present on both the upper and lower epidermal surfaces and varied in size and shape. They were cylindrical, claviform or a combination of the two. In addition, they were rounded at the apex and their base were flat to round (Figure 4) with

Los asci en las superficies de las hojas con los síntomas atípicos fueron inicialmente de color blanco a crema (Figura 2D). Al final de la tercera semana se habían vuelto grises o cafés (Figura 2C). En algunas muestras se formaron asci en ambas superficies de la hoja. Sin embargo, en la mayoría de los casos se observaron más asci en la superficie de la hoja adaxial. En las hojas altamente infectadas, las manchas o ampollas cloróticas se unieron y cubrieron grandes áreas de la superficie de la hoja.

### Aislamiento e identificación de la especie *Taphrina*

De los tres métodos utilizados para aislar patógenos solo el método de caída de blastosporas fue exitoso. Las esporas se descargaron en el agar dentro de las 24 h y las colonias aisladas (blastosporas originadas en asci individuales) que se formaron se transfirieron



**Figure 3.** *Taphrina caerulescens* pure cultures: A) growth after 24 h (Spore fall method); B) fourteen-day old culture of *T. caerulescens*.

**Figura 3.** Cultivos puros de *Taphrina caerulescens*: A) crecimiento después de 24 h (método de caída de esporas); B) cultivo de *T. caerulescens* de 14 d de edad.

some displaying root-like appendages; an important characteristic for differentiating *T. caerulescens* from other *Taphrina* spp. (Figures 4G, 4H, 4I). The asci were wedged between the epidermal cells and measured  $45 - 75 \mu\text{m} \times 10 - 22 \mu\text{m}$  with an average of  $65 \times 17 \mu\text{m}$ , ( $n=30$ ). Ascospores were not observed within the *ascus*, instead they were filled with hundreds of blastospores which measured  $3 - 5.5 \times 1.5 - 2.0 \mu\text{m}$  with an average of  $4.2 \times 1.8 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ). Length was calculated with a standard error of 1.602 and the standard deviation was 8.777. Width was calculated with a standard error of 0.538 with a standard deviation of 2.947. These morphometric characteristics were within the dimensions reported for *T. caerulescens* (Mix, 1949; Taylor and Birdwell, 2000).

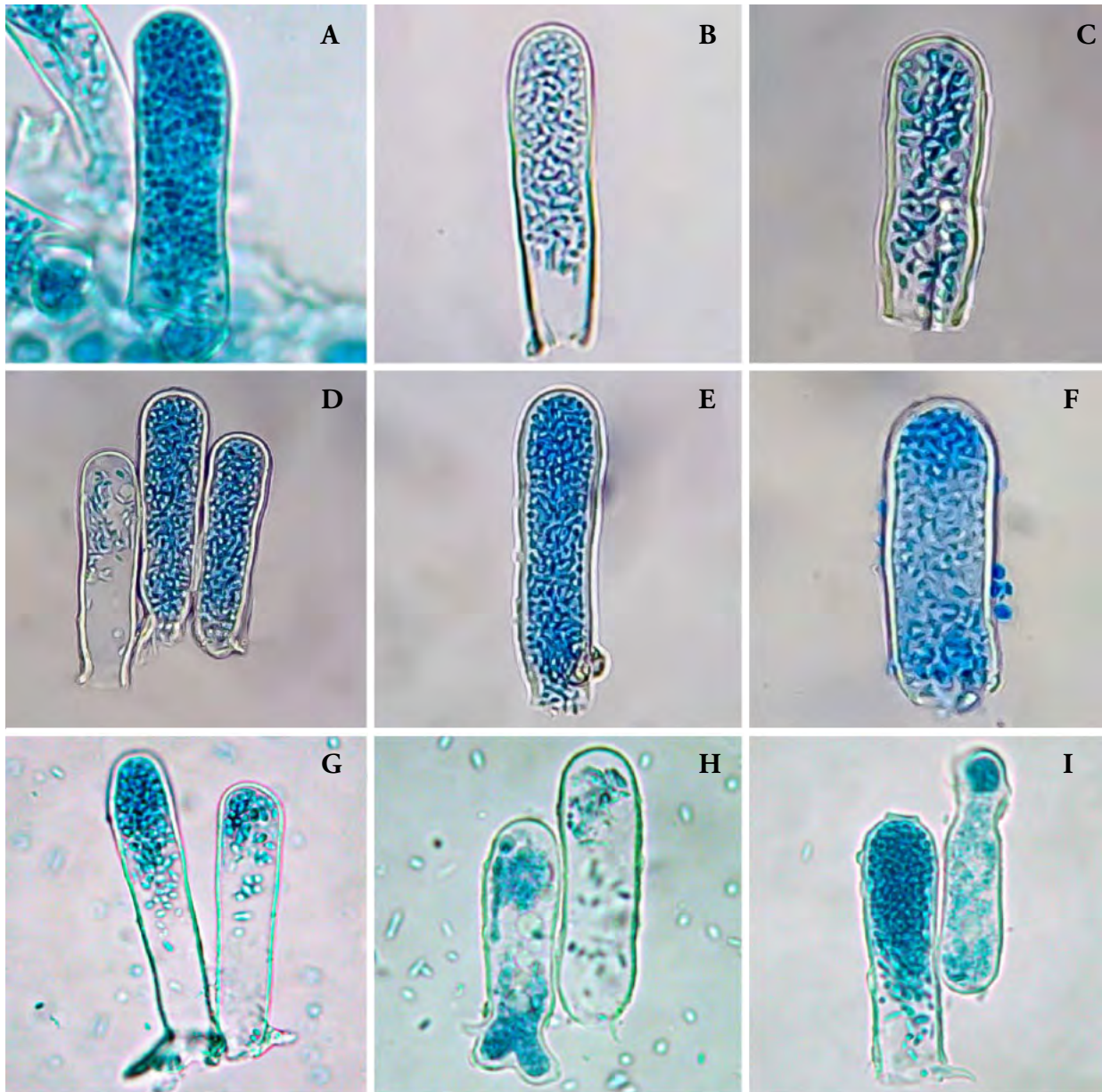
### Description of blastospores

Although the blastospores varied in size and shape, they were generally oval-shaped and reproduced by budding. On average, they measured  $4.47 \mu\text{m}$  in length with a minimum and maximum range of  $3 \mu\text{m}$  and  $6 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ). The standard error was 0.164 with a standard deviation of 0.899. The average

a medios frescos y se incubaron a  $20^\circ\text{C}$  (Figura 3A). Un aislado de cada sitio de muestreo fue purificado y mantenido. Las colonias maduras eran de color rosa claro a crema y con superficies convexas lisas con bordes continuos (Figura 3B). Esta descripción se ajusta a las características de *T. caerulescens* (Mix, 1949; Taylor y Birdwell, 2000; Bacigálová *et al.*, 2003; Selbmann *et al.*, 2014).

### Descripción de asci

Los asci estuvieron presentes en las superficies epidérmicas superior e inferior y variaban en tamaño y forma. Eran cilíndricos, claviformes o una combinación de los dos. Además, se redondearon en el vértice y su base era de plana a redonda (Figura 4) exhibiendo algunos apéndices con apariencia de raíces; una característica importante para diferenciar *T. caerulescens* de otras especies de *Taphrina*. (Figuras 4G, 4H, 4I). Los asci se encajonaron entre las células epidérmicas y midieron  $45 - 75 \mu\text{m} \times 10 - 22 \mu\text{m}$  con un promedio de  $65 \times 17 \mu\text{m}$ , ( $n=30$ ). No se observaron ascosporas dentro del *ascus*, sino que se llenaron con cientos de blastosporas que midieron  $3 - 5.5 \times 1.5 - 2.0 \mu\text{m}$  con un promedio de  $4.2 \times 1.8 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ). La longitud



**Figure 4.** Variation in shapes of mature asci of *Taphrina caerulescens* infecting *Q. eduardii*  
**Figura 4.** Variación en las formas de asci maduro de *Taphrina caerulescens* que infecta *Q. eduardii*

width was 2.63 mm with a minimum and maximum range of 2 mm and 4 mm. The standard error was 0.112 and the standard deviation was 0.614 (n=30). These morphometric characteristics were similar to the dimensions previously reported for *T. caerulescens* (Mix, 1949; Taylor and Birdwell, 2000).

se calculó con un error estándar de 1.602 y la desviación estándar fue 8.777. El ancho se calculó con un error estándar de 0.538 y una desviación estándar de 2.947. Estas características morfométricas estaban dentro de las dimensiones reportadas para *T. caerulescens* (Mix, 1949; Taylor y Birdwell, 2000).

### Biochemical analyses to differentiate *Taphrina* from other yeast genus

Of the six isolates of *Taphrina* obtained, three were used to perform these tests. The reactions for Diazonium blue B (Figures 5C, 5D) and for DNase (Figures 5E, 5F) activities were both negative; however, a positive reaction was observed for the urease activity (Figures 5A, 5B) where there was a colour change from orange to pink. These results were similar to those obtained by Hagler and Ahearn (1981), Prillinger *et al.* (1990) and Rodrigues and Fonseca (2003), to *Taphrina caerulescens*. All the isolates gave similar results.

#### Assimilation of carbon sources to identify the *Taphrina* sp.

*Taphrina caerulescens* was capable of assimilating glucose, trehalose, and D-xylose, which was evident as a colour change from orange to yellow 7 d after the solutions were inoculated with the yeast. There were no significant changes in the other samples: control, saccharose, raffinose and sorbitol (Figure 6). These provided further proof that the organism in question is indeed *T. caerulescens* as these results coincide with those from studies by Seeliger (1956), Van der Walt and Hopsu-Havu (1976), Sen and Komagata (1979) Hagler and Ahearn (1981), Prillinger *et al.* (1990), Nagao and Katumoto (1998) and Rodríguez and Fonseca (2003). The three isolates used gave similar results in all of the repetitions.

#### Molecular identification PCR reaction and sequencing

Amplified DNA fragments were viewed using the ChemiDoc XRS+System after electrophoresis at 75 V on 1% agarose gel stained with redsafe (Figure 7). After being sequenced, they were analysed with the NCBI BLAST. The fragment sequence CGA-ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGG-TATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGTGT-CATTAATCTCTCAACAGACCACTTGGTTC-CAAACCGAGTCGGCCTGTCGATGTTGGA-GGCTGCGACGGGTNCGGCCCTTCGC-TCCTCTCAAATGA was closest to the *T. caerulescens* strain CBS 351.35 ascension number AF492081.1 with 99% similitude and a query cover of 100%.

### Descripción de blastosporas

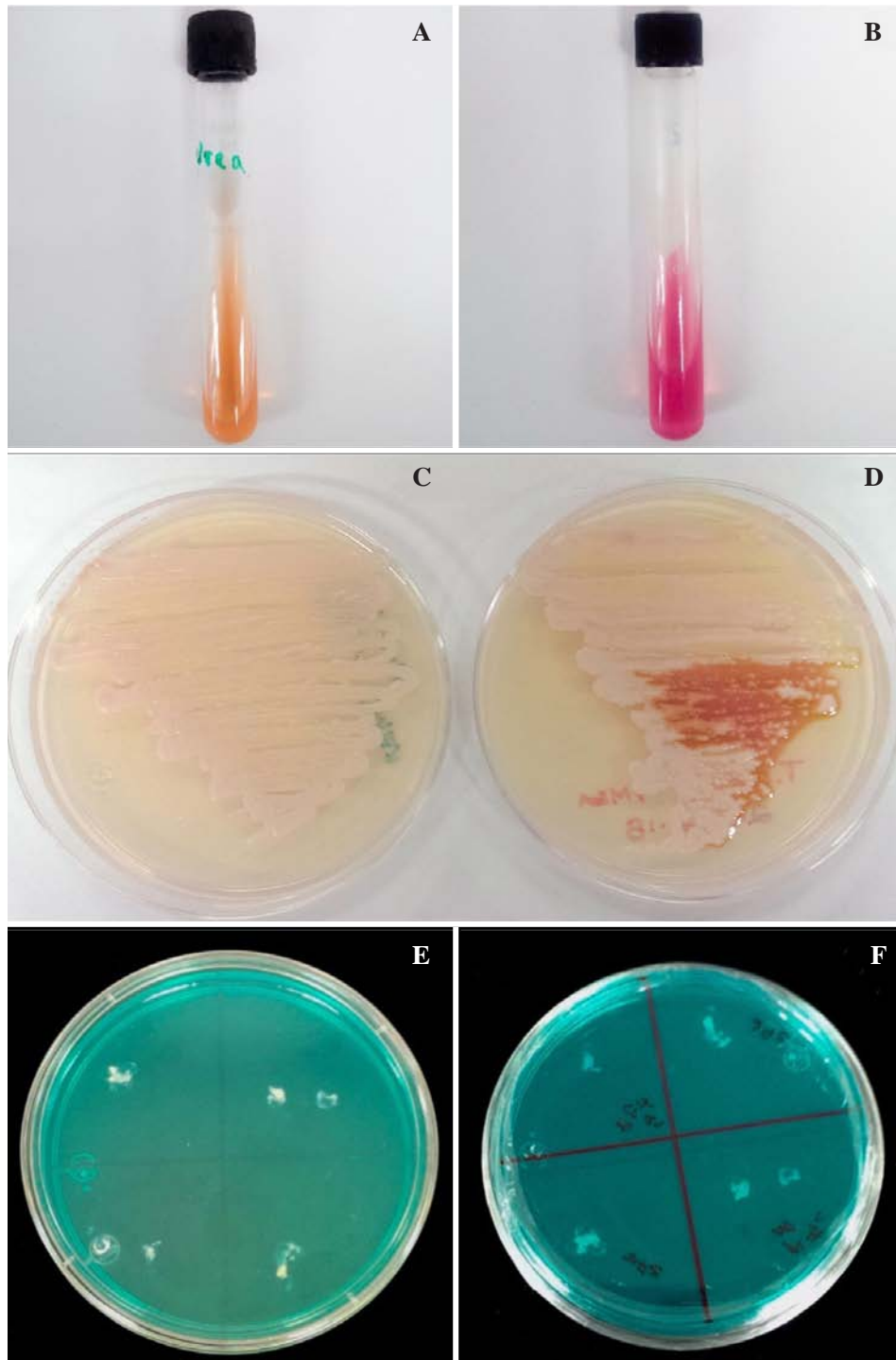
Aunque las blastosporas variaban en tamaño y forma, por lo general tenían forma ovalada y se reproducían por brotes. En promedio, midieron 4.47 mm de longitud con un rango mínimo y máximo de 3 mm y 6 mm (n=30). El error estándar fue de 0.164 con una desviación estándar de 0.899. El ancho promedio fue de 2.63 mm con un rango mínimo y máximo de 2 mm y 4 mm. El error estándar fue de 0.112 y la desviación estándar fue de 0.614 (n=30). Estas características morfométricas fueron similares a las dimensiones reportadas para *T. caerulescens* (Mix, 1949; Taylor y Birdwell, 2000).

#### Análisis bioquímico para diferenciar *Taphrina* de otros géneros de levadura

De los seis aislamientos de *Taphrina* obtenidos, tres se utilizaron para realizar estas pruebas. Las reacciones para el azul de diazonio B (Figuras 5C, 5D) y para las actividades de ADNasa (Figuras 5E, 5F) fueron ambas negativas; sin embargo, se observó una reacción positiva para la actividad de la ureasa (Figuras 5A, 5B) donde hubo un cambio de color de naranja a rosa. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Hagler y Ahearn (1981), Prillinger *et al.* (1990) y Rodríguez y Fonseca (2003), para *Taphrina caerulescens*. Todos los aislamientos dieron resultados similares.

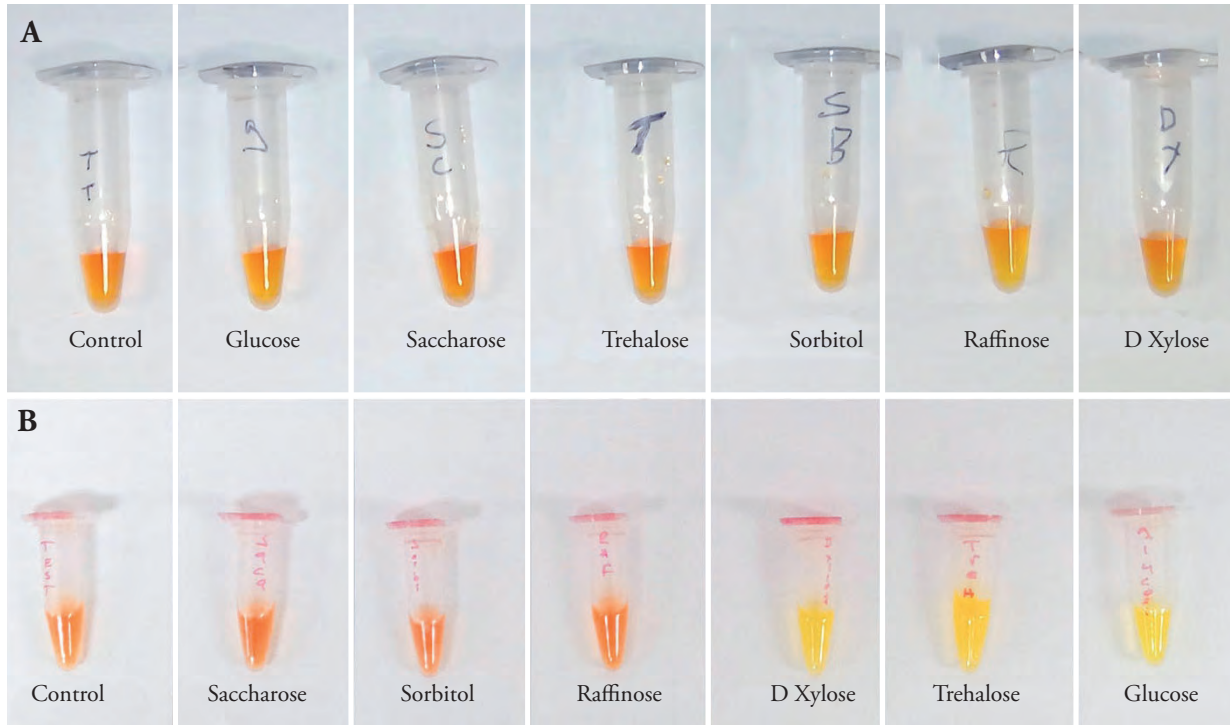
#### Asimilación de fuentes de carbono para identificar la especie *Taphrina*.

*Taphrina caerulescens* fue capaz de asimilar glucosa, trehalosa y D-xilosa, que fue evidenciado con un cambio de color de naranja a amarillo 7 d después de inoculan que las soluciones con la levadura. No hubo cambios significativos en las otras muestras: testigo, sacarosa, rafinosa y sorbitol (Figura 6). Estos proporcionaron una prueba más de que el organismo en cuestión es de hecho *T. caerulescens*, ya que estos resultados coinciden con otros de los estudios de Seeliger (1956), Van der Walt y Hopsu-Havu (1976), Sen y Komagata (1979) Hagler y Ahearn (1981), Prillinger *et al.* (1990), Nagao y Katumoto (1998) y Rodríguez y Fonseca (2003). Los tres aislamientos utilizados dieron resultados similares en todas las repeticiones.



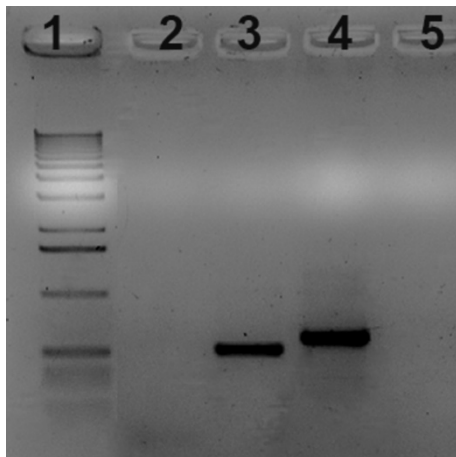
**Figure 5.** Differentiation tests: A) test tube with urease media; B) urease media 72 h after inoculation with *T. caeruleum*; C). *T. caeruleum* in PDA 0 h after inoculation; D) *T. caeruleum* 24 h after being inoculated with Diazonium blue B Salts; E) DNase media inoculated with *T. caeruleum* 0 h after inoculation; F) DNase media inoculated with *T. caeruleum* 72 h after inoculation with *T. caeruleum*

**Figura 5.** pruebas de diferenciación: A) tubo de ensayo con medios de ureasa; B) medios de ureasa 72 h después de la inoculación con *T. caeruleum*; C). *T. caeruleum* en PDA, 0 h después de la inoculación; D) *T. caeruleum* 24 h después de haber sido inoculado con sales azules de diazonio B; E) medios de DNasa inoculado con *T. caeruleum*, 0 h después de la inoculación; F) medios de DNasa inoculados con *T. caeruleum* 72 h después de la inoculación con *T. caeruleum*.



**Figure 6.** Results of biochemical test: A) Eppendorf tubes with 2% sugar solution and phenol red indicator; B) sugar solutions 7 d after inoculation with *T. caerulescens*.

**Figura 6.** Resultados de la prueba bioquímica: A) tubos Eppendorf con solución de azúcar al 2% e indicador de rojo de fenol; B) soluciones de azúcar 7 días después de la inoculación con *T. caerulescens*.



**Figure 7.** Gel of genomic DNA amplified with primer pair ITS 1 and ITS 4: Lane 1, 100 bp ladder; Lane 2, negative control; Lane 3, pure culture genomic DNA; Lane 4, genomic DNA from leaves with *T. caerulescens* symptoms.

**Figure 7.** Gel de ADN genómico amplificado con el par de cebadores ITS 1 e ITS 4: Carril 1, escalera de 100 pb; Carril 2, control negativo; Carril 3, ADN genómico de cultivo puro; Carril 4, ADN genómico de hojas con síntomas de *T. caerulescens*.

### Identificación molecular de reacción de PCR y secuenciación

Los fragmentos de ADN amplificados se observaron utilizando el sistema ChemiDoc XRS + después de la electroforesis a 75 V en gel de agarosa al 1% teñido con Redsafe (Figura 7). Después de ser secuenciados, se analizaron con el NCBI BLAST. La secuencia de fragmentos CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCTCAACAGACCACTTGGTTCCAAACCGAGTCGGCCTGTCGATGTTGGAGGCTGCGACGGGGTN-NCGGCCCCTTCGCTCCTCTCAAATGA fue más cercana a la cepa de *T. caerulescens* CBS 351.35 número de ascensión AF492081.1, con 99% de similitud y una cobertura de consulta de 100%.

### Patogenicidad

Los síntomas de la ampolla se observaron 35 d después de la inoculación en el 25% de las plantas

## Pathogenicity

Blister symptoms were observed 35 d after inoculation in 25% of the inoculated plants. Birdwell (1996) used the same protocol and reported that 30% of the infected plants developed symptoms. Analysis of thin sections of the infected tissue by light microscopy revealed immature ascus on the upper epidermis, and hypertrophy and hyperplasia of the leaf's cells in the infected zone. This together with all the other experiments presented confirms that the species of *Taphrina* on leaf of *Q. eduardii* in Aguascalientes, is *T. caerulescens*.

## CONCLUSIONS

Morphological, biochemical, molecular analysis combined with pathogenicity tests, confirm that the pathogen responsible for the leaf blisters of *Q. eduardii* in Sierra Fria of Aguascalientes, Mexico, is *T. caerulescens*. This is the first study which combines all of these techniques to confirm the identity of *T. caerulescens*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank first of all CONACYT, and the Autonomous University of Aguascalientes (UAA); Mr. Francisco Juarez ex forest ranger, our guide for the past 3 years; Jose Luis Carrasco Rosales, lab technician of the Microbiology Department of the UAA, and finally, all the members of the FUNLAB of Dra. Suha Jabaji, of the McGill University, Montreal, Canada.

## LITERATURE CITED

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology (5 ed.). Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. pp: 398-402.
- Azmat, M. A., I. A. Khan, H. M. N. Cheema, I. A. Rajwana, A. S. Khan, and A. A. Khan, 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. J. Zhejiang University. Sci. B. 13: 239 - 243.
- Bacigálová, K. 2010. Flora Slovenska X/2. Bratislava: VEDA. Vydavateľstvo Slovenskej Akadémie vied. pp: 1 - 83.
- Bacigálová, K., K. Lopandic, M. G. Rodrigues, A. Fonseca, M. Herzberg, W. Pinsker, and H. Prillinger. 2003. Phenotypic and genotypic identification and phylogenetic characterisation of *Taphrina* fungi on alder. Mycol. Progr. 2: 179 - 196.
- Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, and A. Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press, St. Paul, USA. 1252 p.
- Flannigan, B., R. A. Samson, and J. D. Miller. 2001. Microorganisms in Home and Indoor Work Environments:

inoculadas. Birdwell (1996) uso el mismo protocolo e informó que el 30% de las plantas infectadas desarrollaron síntomas. El análisis de secciones delgadas del tejido infectado por microscopía óptica reveló un ascus inmaduro en la epidermis superior, e hipertrofia e hiperplasia de las células de la hoja en la zona infectada. Esto junto con todos los otros experimentos presentados confirma que la especie *Taphrina* en la hoja de *Q. eduardii* en Aguascalientes, es *T. caerulescens*.

## CONCLUSIONES

El análisis morfológico, bioquímico y molecular combinado con pruebas de patogenicidad confirma que el patógeno responsable de las ampollas en la hoja de *Q. eduardii* en la Sierra Fria de Aguascalientes, México, es *T. caerulescens*. Este es el primer estudio que combina todas estas técnicas para confirmar la identidad de *T. caerulescens*.

—Fin de la versión en Español—



- Diversity, Health Impacts, Investigation and Control. London: Taylor and Francis. 490 p.
- Hagler, A. N. and D. G. Ahearn. 1981. Rapid Diazonium Blue B test to detect Basidiomycetous yeasts. Int. J. Syst. Bacteriol. 3: 204 - 208.
- Harju, S., H. Fedosyuk, and K. R. Peterson. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. BMC Biotechnol 4: 8.
- Isheng, J., E. Tanaka, H. Masuya, R. Tanaka, Y. Hirooka, R. Endoh, and T. Kikuchi. 2014. Comparative genomics of *Taphrina* fungi causing varying degrees of tumorous deformity in plants. Genome Biol. Evol. 6: 861 - 872.
- Kali, A., S. Srirangaraj, and P. Charles. 2015. A cost-effective carbohydrate fermentation test for yeast using microtitre plate. Indian J. Med. Microbiol. 33: 293 - 295.
- Kramer, C., L. 1960. Morphological development and nuclear behaviour in the genus *Taphrina*. Mycologia. 52: 295 - 320.
- Lian, C., M. Miwa, and T. Hogetsu. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. Heredity 87: 88 - 98.
- Mix, A. J. 1949. A monograph of the genus *Taphrina*. University of Kansas Science Bulletin 33: 3 - 167.
- Moreno R., O., J. G. Marmolejo-Monsiváis, C. E. Moreno-Manzano, y K. Pérez H. 2015. Primer reporte de *Taphrina caerulescens* en *Quercus* spp. de la Sierra Fria de Aguascalientes. Memorias del XI Congreso Mexicano de Micología. pp. 133 - 134.
- Nagao, H., and K. Katumoto. 1998. Leaf blister of *Quercus phillyraeoides* caused by *Taphrina caerulescens*. Mycoscience 39: 173 - 178.

- Petrýdesová, J., K. Bacigálová, and P. Sulo. 2013. The reassignment of three "lost" *Taphrina* species (*Taphrina bullata*, *Taphrina insititiae* and *Taphrina rhizophora*) supported by the divergence of nuclear and mitochondrial DNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3091 - 3098.
- Porebski, S., L. G. Bailey, and B. R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8 - 15.
- Prillinger, H., C. Dorfler, G. Laaser, B. Eckerlein, and L. Lehle. 1990. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie hoherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil I: Schizosaccharomycetales, Protomyces-Typ. *Z. Mykol.* 56: 219 - 250.
- Quintana-Obregón, E. A., M. Plascencia-Jatomea, A. Burgos-Hernández, P. Figueroa-López, and M. Onofre Cortez-Rocha. 2013. Isolation and identification of fungi from leaves infected with false mildew on safflower crops in the Yaqui Valley, Mexico.
- Rodríguez, M. G., and A. Fonseca. 2003. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 607 - 616.
- Seeliger, H. P. R. 1956. Use of a urease test for the screening and identification of *Cryptococci*. *J. Bacteriol.* 72: 127- 131.
- Selbmann, L., L. Zucconi, S. Onofri, C. Cecchini, D. Isola, B. Turchetti, and P. Buzzini. 2014. Taxonomic and phenotypic characterization of yeasts isolated from worldwide cold rock-associated habitats. *Fungal Biol.* 118: 61 - 71.
- Sen, K., and K. Komagata. 1979. Distribution of urease and extracellular DNase in yeast species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25: 127 - 135.
- Shiran, B., S. Momeni, and M. Khodambashi. 2004. A modified CTAB method for isolation of DNA from mint plants (*Mentha* spp.) *In: Proceedings of the fourth international Iran and Russia conference*, pp. 391 - 395.
- Sjamsuridzal, W., Y. Tajiri, H. Nishida, T. B. Thuan, H. Kawasaki, A. Hirata, A. Yokota, and J. Sugiyama, J. 1997. Evolutionary relationships of members of the genera *Taphrina*, *Protomyces*, *Schizosaccharomyces* and related taxa within the archiascomycetes: integrated analysis of genotypic and phenotypic characters. *Mycoscience* 38: 267 - 280.
- Tavares, S., J. Inácio, Á. Fonseca, and C. Oliveira. 2004. Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 973 - 982.
- Taylor J., and D. O. Birdwell. 2000. A scanning electron microscopic study of the infection of water oak (*Quercus nigra*) by *Taphrina caerulescens*. *Mycologia* 92: 309 - 311.
- Toader, V. A., I. C. Moldovan, N. Șofletea, I. V. Abrudan, and A. L. Curtu. 2009. DNA isolation and amplification in oak species (*Quercus* spp.). *Bulletin of the Transilvania University of Brasov* 2: 45 - 50.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2017. U.S. National Fungus Collections Database results *Taphrina caerulescens*. from [https://nt.arsgrin.gov/fungalatabases/new\\_allViewGenBank.cfm?thisName=Taphrina caerulescens](https://nt.arsgrin.gov/fungalatabases/new_allViewGenBank.cfm?thisName=Taphrina%20caerulescens) and organism type Fungus. (Access: March 2017).
- Van der Walt P. J. and V. K. Hopsu-Havu. 1976. A colour reaction for the differentiation of ascomycetous and hemibasidiomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 42: 157 - 163.
- White T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis, M. A, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, San Diego. pp: 315 - 322.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *In: Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. (eds). The Yeasts. 4th Edition.* pp: 77 - 100.

