

## **Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas**

### **Cultural and morphological characterization and identification of ten *Fusarium* isolates from stored *Leucaena leucocephala* cv. Peru seeds**

J. C. Lezcano<sup>1</sup>, B. Martínez<sup>2</sup> y O. Alonso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba

E-mail: [juan.lezcano@indio.atenas.inf.cu](mailto:juan.lezcano@indio.atenas.inf.cu)

<sup>2</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Mayabeque, Cuba

#### **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue caracterizar cultural y morfológicamente diez aislamientos de *Fusarium*, obtenidos de semillas de *L. leucocephala* cv. Perú almacenadas, con vistas a su clasificación taxonómica. Sus cultivos puros se conservaron en tubos Eppendorf con medio Agar Papa y Dextrosa (APD), en cámara fría a 10°C. La siembra de cada aislamiento se realizó en tres placas Petri, esterilizadas, de 9 cm de diámetro; estas contenían, separadamente, los medios APD y Agar Papa Sacarosa (APS), que constituyeron las réplicas; se colocó en su centro un disco micelial de 7 mm de diámetro, procedente de cultivos con 10-15 días de edad, sembrados también en dichos medios. Posteriormente, las placas se sellaron con papel parafinado y se incubaron durante diez días a 25°C, con alternancia de 8 h de luz/16 h de oscuridad, o a oscuridad constante. Las variables culturales medidas fueron: el color de la colonia en el anverso y el reverso, la textura y el crecimiento lineal y aéreo; y como morfológicas se evaluaron: el tamaño, la forma y el color de las estructuras vegetativas y reproductivas que aparecieron en los cultivos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y los datos se procesaron estadísticamente a través de un análisis descriptivo. Para la identificación de los hongos se utilizaron diferentes claves taxonómicas. Los aislamientos 10, 18 y 29 se correspondieron con las características descritas en la literatura científica para la especie *Fusarium oxysporum* Schlecht; el 17, el 28 y el 30, con *Fusarium sambucinum* Fuckel; el 27, con *Fusarium semitectum* Berk & Rav.; el 25 y el 26, con *Fusarium incarnatum* (Rob) Sacc, y el 31, con *Fusarium chlamydosporum* Wollenw & Reinking, lo que permitió la identificación de cinco especies de *Fusarium* asociadas a las simientes almacenadas.

Palabras clave: *Fusarium*, identificación, *Leucaena leucocephala* cv. Perú, semillas

#### **Abstract**

The objective of this work was to characterize cultural and morphologically ten *Fusarium* isolates, obtained from stored *Leucaena leucocephala* cv. Peru seeds, aiming at their taxonomic classification. Their pure cultures were preserved in Eppendorf tubes with Potato Dextrose Agar (PDA) medium, in cold chamber at 10°C. Each isolate was planted in three sterilized Petri dishes, of 9 cm diameter; they contained, separately, the PDA and Potato Sucrose Agar (PSA) media, which constituted the replicates; at their center a mycelial disk was placed, of 7 mm diameter, from 10-15-day-old cultures, also planted in such media. Afterwards, the dishes were sealed with wax paper and incubated for ten days at 25°C, alternating 8 h of light/16 h of darkness, or in constant darkness. The measured cultural variables were: colony color on the obverse and reverse, texture and lineal and aerial growth; and the morphological variables were: size, shape and color of the vegetative and reproductive

structures which appeared in the cultures. A completely randomized design was used, and the data were statistically processed through a descriptive analysis. For the fungi identification different taxonomic keys were used. Isolates 10, 18 and 29 were in correspondence with the characteristics described in scientific literature for the species *Fusarium oxysporum* Schlecht; 17, 28 and 30, to *Fusarium sambucinum* Fuckel; 27, to *Fusarium semitectum* Berk & Rav.; 25 and 26, to *Fusarium incarnatum* (Rob) Sacc, and 31, to *Fusarium chlamydosporum* Wollenw & Reinking, which allowed the identification of five *Fusarium* species associated to the stored seeds.

Key words: *Fusarium*, identification, *Leucaena leucocephala* cv. Peru, seeds

### Introducción

Uno de los géneros fungosos más investigados por la comunidad científica internacional lo constituye *Fusarium* Link, el cual agrupa numerosas especies de trascendental importancia para la agricultura, la economía y la salud de los animales y el hombre, debido a su acción devastadora.

No obstante, desde el punto de vista benéfico, existen algunas cepas antagonistas (por ejemplo, de la especie *Fusarium oxysporum* Schlecht), que se han utilizado como agentes de control biológico (Arbeláez, 2000) y micoherbicidas (Magani *et al.*, 2011). Un número mayor de especies se reconoce como toxicogénicas y fitopatógenas, y al informarlas se relacionan con diversas enfermedades en diferentes cultivos, tales como: la marchitez de las plantas, las manchas y los añublos foliares; el aborto de las flores y la pudrición de las raíces, los tallos, los frutos y los granos (López *et al.*, 2004; Formiga y Paz, 2009; Pérez *et al.*, 2009; Ocom *et al.*, 2011).

En la leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala* –importante arbustiva multipropósito para la ganadería en Cuba– y sus cultivares también se han observado los efectos devastadores de estos agentes, principalmente asociados a la pudrición de sus semillas o la disminución de su poder germinativo (hasta un 50%), al retardo del desarrollo y la supervivencia de las plántulas emergidas en condiciones de campo, o a su pudrición (Moreno *et al.*, 1988; Delgado *et al.*, 1989; Pupo y Heredia, 1998; Lezcano *et al.*, 2007; Borges y Urdaneta, 2010). De ahí que el objetivo de este trabajo fuera conocer qué especies del género *Fusarium* estaban asociadas a las semillas de leucaena almacena-

### Introduction

One of the fungal genera most studied by the international scientific community is *Fusarium* Link, which includes many highly important species for agriculture, economy and animal and human health, because of their devastating action.

However, from the beneficial point of view, there are antagonistic strains (for example, of the species *Fusarium oxysporum* Schlecht), which have been used as biological control agents (Arbeláez, 2000) and mycoherbicides (Magani *et al.*, 2011). A higher number of species is known as toxicogenic and phytopathogenous, and when reported they are related to diverse diseases in different crops, such as: plant wilting, spots and leaf blight; flower abortion and root, stem, fruit and grain rot, (López *et al.*, 2004; Formiga and Paz, 2009; Pérez *et al.*, 2009; Ocom *et al.*, 2011).

In the legume tree *Leucaena leucocephala* –important multipurpose tree for livestock production in Cuba– and its cultivars, the devastating effects of these agents have also been observed, mainly associated to seed rot or decrease of the germination rate (up to 50%), delayed development and survival of the seedlings emerged under field conditions, or their rotting (Moreno *et al.*, 1988; Delgado *et al.*, 1989; Pupo and Heredia, 1998; Lezcano *et al.*, 2007; Borges and Urdaneta, 2010). Therefore, the objective of this work was to know what species of the *Fusarium* genus were associated to the stored *L. leucocephala* seeds, which identification was made through their cultural and morphological identification.

### Materials and Methods

*Location.* The studies were conducted in the laboratory of plant mycology of the National

das, cuya identificación se realizó a través de su caracterización cultural y morfológica.

### Materiales y Métodos

**Localización.** Las investigaciones se desarrollaron en el laboratorio de micología vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), en Mayabeque, y el de protección de plantas de la Estación Experimental "Indio Hatuey", en Matanzas, Cuba.

**Material vegetal.** Los aislamientos se hicieron de semillas de *L. leucocephala* cv. Perú con seis y 18 meses de almacenamiento al ambiente, procedentes del almacén de la finca de semillas "La Rioja", que pertenece a la Empresa Pecuaria "José Martí" en la provincia de Matanzas, Cuba.

**Prueba de patología.** Se aplicó a las semillas el test de cámara húmeda (ISTA, 1999).

**Aislamientos de *Fusarium*.** Se utilizaron diez aislamientos puros de *Fusarium* (No. 10, No. 17, No. 18, No. 25, No. 26, No. 27, No. 28, No. 29, No. 30 y No. 31), conservados en tubos Eppendorf con medio Agar Papa y Dextrosa (APD).

**Siembra de los aislamientos.** La siembra se realizó en tres placas Petri de cristal, esterilizadas, de 9 cm de diámetro, que constituyeron las réplicas, las cuales contenían los medios de cultivos APD y Agar Papa Sacarosa (APS); para ello se colocó en su centro un disco micelial de 7 mm de diámetro, procedente de cultivos con 10-15 días de edad, sembrados también en dichos medios. Posteriormente, las placas se sellaron con papel parafinado (parafilm) y se incubaron durante 10 días a 25°C, con alternancia de 8 h de luz/16 h de oscuridad, o a oscuridad constante, según lo requerido para cada aislamiento.

**Caracterización cultural.** Los caracteres cualitativos y cuantitativos evaluados fueron: color de la colonia en el anverso y el reverso (mediante la tabla de colores de Rayner, 1970), textura, pigmentación del medio (por apreciación visual del pigmento producido y su intensidad), crecimiento lineal (diámetro de la colonia expresado en centímetros por día, obtenido en dos mediciones diarias a las 8:00 a.m. y a las 4:00 p.m. hasta el décimo día) y crecimiento aéreo.

Center of Agricultural Health (CENSA), in Mayabeque, and the plant protection laboratory of the Experimental Station "Indio Hatuey", in Matanzas, Cuba.

**Plant material.** The isolations were made from *L. leucocephala* cv. Peru seeds with six and 18 months of storage under environment conditions, from the storehouse of the seed farm "La Rioja", which belongs to the "José Martí" Livestock Production Enterprise, Matanzas province, Cuba.

**Pathology test.** The moist chamber test was applied to the seeds (ISTA, 1999).

***Fusarium* isolates.** Ten pure *Fusarium* isolates were used (No. 10, No. 17, No. 18, No. 25, No. 26, No. 27, No. 28, No. 29, No. 30 and No. 31), preserved in Eppendorf tubes with Potato Dextrose Agar (PDA) medium.

**Isolate planting.** The isolates were planted in three sterilized glass Petri dishes, of 9 cm diameter, which constituted the replicates, containing the PDA and Potato Sucrose Agar (PSA) culture media; for such purpose, a mycelial disk, 7 mm diameter, was placed in its center, from 10-15 day-old cultures, also planted in the above-mentioned media. Afterwards, the dishes were sealed with wax paper (parafilm) and incubated during 10 days at 25°C, alternating 8 h of light/16 h of darkness, or in constant darkness, according to the requirement for each isolate.

**Cultural characterization.** The evaluated qualitative and quantitative traits were: colony color on the obverse and reverse (through Rayner's, 1970, color chart, texture, pigmentation of the medium (through visual observation of the produced pigment and its intensity), lineal growth (colony diameter expressed in centimeters per day, obtained in two daily measurements at 8:00 a.m. and 4:00 p.m., until the tenth day) and aerial growth.

**Morphological characterization.** The following was taken into consideration: presence or absence of macroconidia and microconidia, chlamydospores and sporodochia; as well as the shape and size of the first two ones, the position of the second, and the color of the third ones.

*Caracterización morfológica.* Se tuvo en cuenta: la presencia o ausencia de los macroconidios y los microconidios, las clamidosporas y los esporodoquios; así como la forma y el tamaño de los dos primeros, el tamaño y la posición de las segundas, y la coloración de los terceros.

A cada una de estas estructuras, presentes en las preparaciones microscópicas, se les hicieron 50 mediciones, para lo cual se usó una escala micrométrica acoplada a un microscopio óptico Zeiss Estandar 25 (con lentes oculares 10-100 x), con el objetivo de corroborar la clasificación de la especie de *Fusarium*.

*Diseño experimental y análisis estadístico.* Se empleó un diseño completamente aleatorizado y los datos se procesaron estadísticamente a partir de un análisis descriptivo.

*Clave taxonómica.* Para la identificación de las especies de *Fusarium* se utilizaron las claves propuestas por Booth (1969), Booth (1977), Singh *et al.* (1991) y López (2003). También se consideraron algunos criterios relacionados con la taxonomía del género *Fusarium*, expuestos por Gerlach y Nirenberg (1982), Nelson *et al.* (1983) y López *et al.* (1999).

### Resultados y Discusión

En cuanto a la caracterización cultural de los aislamientos No. 10, No. 18 y No. 29, se observaron colonias de crecimiento rápido (con 64 mm como promedio al séptimo día de incubación), cuando se cultivaron en APD a 25°C. Además, presentaron un micelio aéreo abundante y algodonoso, a veces afelpado, de color blanquecino, con tonalidades rosa violáceo y púrpura, fundamentalmente en el centro de la colonia (fig. 1a); y una pigmentación variable, con predominio de los colores rosa violáceo y púrpura en el anverso de la placa, y azul grisáceo-verdoso en el reverso de esta.

Desde el punto de vista morfológico, los aislamientos se caracterizaron por presentar conidióforos que surgieron lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, simples y ramificados; esporodoquios ausentes, células conidiógenas

On each of these structures, present in the microscopic preparations, 50 measurements were made, for which a micrometric scale, coupled with an optic microscope Zeiss Standard 25 (with ocular lenses 10-100x) was used, in order to corroborate the classification of the *Fusarium* species.

*Experimental design and statistical analysis.* A completely randomized design was used and the data were statistically processed from a descriptive analysis.

*Taxonomic key.* For the identification of the *Fusarium* species, the keys proposed by Booth (1969), Booth (1977), Singh *et al.* (1991) and López (2003) were used. Some criteria were also considered related to the taxonomy of the *Fusarium* genus, presented by Gerlach and Nirenberg (1982), Nelson *et al.* (1983) and López *et al.* (1999).

### Results and Discussion

Regarding the cultural characterization of isolates No. 10, No. 18 and No. 29, fast-growth colonies were observed (with 64 mm as average on the seventh day of incubation), when they were cultivated in PDA at 25°C. In addition, they showed an abundant and cottony aerial mycelium, sometimes velvety, whitish, with violet rose and purple shades, mainly at the center of the colony (fig. 1a); and variable pigmentation, with predominance of the colors violet rose and purple on the obverse of the Petri dish, and grayish-greenish blue on its reverse.

From the morphological point of view, the isolates showed simple and branched conidiophores that emerged laterally from the hyphae on the aerial mycelium; absent sporodochia, monolocal and subcylindrical conidiogenous cells, hyaline macroconidia, from semi-curved and almost straight (falcated) to curved, pointed in their ends, with three to five septa measuring 26,10-36,74 x 3,0-4,54  $\mu\text{m}$  (fig. 1b) and foot-shaped basal cell; hyaline microconidia (fig. 1c), formed in false heads and abundant, from oval to elliptical shape, with one or two septa of 3,58-4,06 x 2,06-3,02  $\mu\text{m}$ ; and chlamydospores 6,6-10,19  $\mu\text{m}$  in size, abundant,

monolocales y subcilíndricas; macroconidios hialinos, de semicurvos o casi rectos (falcados) a curvados, puntiagudos en sus extremos, con tres a cinco septos de  $26,10-36,74 \times 3,0-4,54 \mu\text{m}$  (fig. 1b) y célula basal en forma de pie; microconidios (fig. 1c) hialinos formados en falsas cabezas y abundantes, de forma oval a elíptica, con uno o dos septos de  $3,58-4,06 \times 2,06-3,02 \mu\text{m}$ ; y clamidosporas de  $6,6-10,19 \mu\text{m}$  de tamaño, abundantes, esféricas (globosas), subglobosas, de paredes lisas, terminales o intercalares y dispuestas individualmente o en pares a lo largo de la hifa.

En APS a  $25^\circ\text{C}$ , dichos aislamientos mostraron colonias blanquecinas con tonalidades violetas (fig. 2), de crecimiento abundante (superior a 40 y 60 mm al cuarto y séptimo día de incubación); pigmentación variable, con predominio de los colores crema blancuzco con alguna tonalidad violeta vinácea en el anverso de la placa y azul violáceo a pálido por su reverso; células conidiógenas monolocales, subcilíndricas; microconidios ovales, elipsoidales, rectos y curvados, formados en falsas cabezas de  $4-10 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ , producidos en fialides laterales simples y cortas; macroconidios falciformes, generalmente de tres a cinco septos, de  $26,5 \times 2,8-4,1 \mu\text{m}$ , atenuados hacia ambos extremos con la célula apical aguda y ligeramente encorvada y la célula basal en forma de pie; y clamidosporas abundantes formadas en hifas,

spherical (globose), subglobose, with smooth walls, terminal or intercalary, and arranged individually or in pairs along the hypha.

In PSA at  $25^\circ\text{C}$ , such isolates showed whitish colonies with violet shades (fig. 2), of abundant growth (higher than 40 and 60 mm on the fourth and seventh day of incubation); variable pigmentation, with predominance of whitish cream with vinaceous violet shades on the obverse of the dish and violet blue on its reverse; monolocal sub-cylindrical conidiogenous cells; oval, ellipsoidal, straight and curved microconidia, arranged in false heads of  $4-10 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$ , produced in lateral, simple and short phialides; falciform macroconidia, generally from three to five septa, of  $26,5 \times 2,8-4,1 \mu\text{m}$ , attenuated towards both ends, with the apical cell acute and slightly bent and the basal cell shaped as a foot; and abundant chlamydospores arranged in hyphae, globose, simple or in pairs, intercalary or terminal.

Similar results were reported by Booth (1969), Booth (1977), Nelson *et al.* (1983), Singh *et al.* (1991), López *et al.* (1999), López (2003), Dueñas *et al.* (2007) and Pierobom and Del Ponte (2011), which coincided with the characteristics of the fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht, which teleomorphic state is unknown.

Isolates No. 17, No. 28 and No. 30 were culturally characterized by showing fast-growth colonies (60-78 mm of diameter as average after

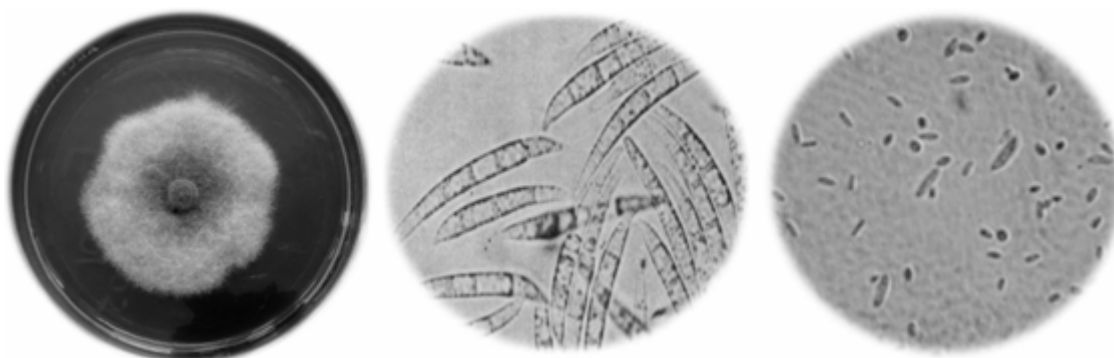


Figura 1. Colonia de *F. oxysporum* (a), macroconidios (b) (x 100) y microconidios (c) (x 100) de *F. oxysporum* en APD.

Figure 1. Colony of *F. oxysporum* (a), macroconidia (b) (x 100) and microconidia (c) (x 100) of *F. oxysporum* in PDA.

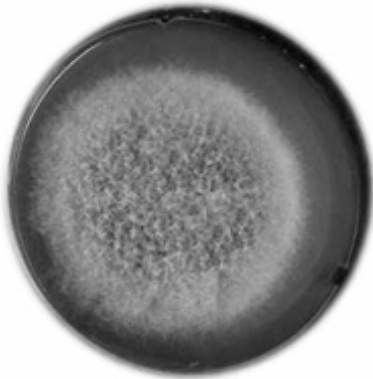


Figura 2. Colonia de *F. oxysporum* sobre el medio APS.

Figure 2. Colony of *F. oxysporum* on PSA medium.

globosas, simples o en pares, intercalares o terminales.

Resultados similares fueron informados por Booth (1969), Booth (1977), Nelson *et al.* (1983), Singh *et al.* (1991), López *et al.* (1999), López (2003), Dueñas *et al.* (2007) y Pierobom y Del Ponte (2011), los cuales coinciden con las características del hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, cuya fase teleomorfa no se conoce.

Los aislamientos No. 17, No. 28 y No. 30 se caracterizaron culturalmente por presentar colonias de crecimiento rápido (de 60-78 mm de diámetro como promedio a los 10 días de incubación, a 25°C sobre APS); micelio aéreo abundante, algodonoso, de color blanquecino y salmón; pigmentación variable, con predominio del color salmón por el anverso de la placa, lo cual corrobora lo planteado por López (2003). Los resultados en cuanto a la ausencia de esporodocios coinciden con los hallados por este autor, a pesar de que los estudios morfológicos no se hicieron en el mismo medio de cultivo (Agar agua hojas de clavel). Los conidióforos también se observaron sobre las hifas en el micelio aéreo, inicialmente eran simples y después ramificados; además, coincidió la presencia de células conidiógenas monolocales, aunque escasamente presentes en los cultivos estudiados. Otros resultados similares fueron: los macroconidios se observaron falciformes, con tres a cinco septos de 9,5-50 x 2,6-7 µm, con la

10 days of incubation, at 25°C on PDA); abundant, cottony aerial mycelium, whitish and salmon pink in color; variable pigmentation, with predominance of the color salmon-pink on the obverse of the Petri dish, which corroborates the statement by López (2003). The results regarding the absence of sporodochia coincide with those found by this author, although the morphological studies were not conducted on the same culture medium (water carnation leaf agar). The conidiophores were also observed on the hyphae in the aerial mycelium, they were initially simple and then branched; in addition, there was the presence of conidiogenous monolocal cells, although scarcely present in the studied cultures. Other similar results were: the macroconidia were observed to be falciform, with three to five septa of 9,5-50 x 2,6-7 µm, with apical cell abruptly slanted and acute and the basal cell pedicellate; the microconidia were absent and the chlamydospores were simple or arranged in groups, terminal, globose to subglobose, measuring 4,5-10,7 µm and smooth walls.

In the PSA medium, fast-growth colonies were obtained (55 mm on the seventh day of incubation at 25°C), which color varied from peach to orange. On the other hand, an abundant and cottony aerial mycelium was observed; the macroconidia were produced only on the dorsal-ventral side, with pointed apical cell, from three to five septa, 30-50 x 3,8-5,1 µm (fig. 3); microconidia absent and globose chlamydospores, of 5,7-10,3 µm diameter, with smooth walls, simple or some arranged in chains. These characteristics coincide with the ones cited by Booth (1977) and Pierobom and Del Ponte (2011) for the species *Fusarium sambucinum* Fuckel (teleomorphic state: *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc).

Regarding isolate No. 27 in PDA, the colonies showed fast growth when incubated for 10 days at 25°C (90 mm of diameter as average). At the same time, the presence of abundant, cottony aerial mycelia, of variable color, from whitish with light coral to light brown orange shades, was observed; fusiform macroconidia, formed on the aerial mycelium in the branched conidiophores,

célula apical abruptamente inclinada y aguda y la célula basal pedicelada; los microconidios ausentes y las clamidosporas simples o dispuestas en grupos, terminales, globosas a subglobosas de 4,5-10,7  $\mu\text{m}$ , y de paredes lisas.

En el medio APS se obtuvieron colonias de crecimiento rápido (de 55  $\mu\text{m}$  al séptimo día de la incubación a 25°C), cuya coloración varió de melocotón a naranja. Por otra parte, se observó un micelio aéreo abundante y algodonoso; los macroconidios se produjeron solamente en la parte dorso ventral, con célula apical puntiaguda, de tres a cinco septos, 30-50 x 3,8-5,1  $\mu\text{m}$  (fig. 3); los microconidios ausentes y las clamidosporas globosas de 5,7-10,3  $\mu\text{m}$  de diámetro, de paredes lisas, simples o algunas dispuestas en cadenas. Estas características coinciden con las citadas por Booth (1977) y Pierobom y Del Ponte (2011) para la especie *Fusarium sambucinum* Fuckel (fase teleomorfa: *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc).



Figura 3. Macroconidios de *F. sambucinum* sobre APS (x 750).

Figure 3. Macroconidia of *F. sambucinum* on PSA (x 750).

Con respecto al aislamiento No. 27 en APD, las colonias presentaron un crecimiento rápido cuando se incubaron durante 10 días a 25°C (de 90 mm de diámetro como promedio). Al mismo tiempo se pudo apreciar la presencia de micelios aéreos abundantes, algodonosos, de coloración

with three (12-38 x 2,3-4,6  $\mu\text{m}$ ) to five septa (20-37 x 3,2-4,01  $\mu\text{m}$ ) and with wedge-shaped basal cell and pointed apical cell (fig.4) and brown, globose, intercalary chlamydospores, arranged alone or in chain, from 8 to 13  $\mu\text{m}$ . Likewise, the absence of microconidia was observed, coinciding with the statements by Booth (1977), López *et al.* (1999) and Pierobom and Del Ponte (2011) for the species *Fusarium semitectum* Berk & Rav (synonymy: *F. pallidoroseum*) (teleomorphic state: unknown).

In isolates No. 25 and No. 26, fast-growth colonies were observed (56-77 mm of diameter as average) in PDA on the seventh day of incubation at 25°C. The aerial mycelia were relatively abundant and had a cottony appearance, whitish in color in young cultures, and ochre and honey in older cultures. The pigmentation of the medium showed a light orange color to salmon-pink and it eventually became somewhat brownish (with coffee-brown shade). López and López (2004) obtained a similar result with the use of the culture media Potato Sucrose Agar No. 1 and No. 3, where they also observed the same salmon pink orange color near the center of the colony followed by a more intense coffee-brown color.

Regarding the morphological traits that prevailed in these isolates, the following stood out: the absence of sporodochia and microconidia, and that the conidiophores which emerged laterally from the hyphae in the aerial mycelium, were simple at first and then branched. The macroconidia were lanceolated, with three to five septa generally, of 6,7-48 x 1,9-5,6  $\mu\text{m}$ , attenuated towards both ends, with a straight and very attenuated apical cell and a slightly papillated basal cell; the chlamydospores were widespread, although they were generally found intercalated between the hyphae, single and in pairs, from globose to sub-globose, with a smooth wall and a size which varied from 5,5 to 9,5  $\mu\text{m}$ . In general, these traits corroborate, to a large extent, the ones reported by López (2003) for the species *Fusarium incarnatum* (Rob.) Sacc. (teleomorphic state: unknown).

variable, de blanquecina con tonalidades coral claro a pardo naranja claro; macroconidios fusiformes, formados sobre el micelio aéreo en los conidióforos ramificados, con tres (de 12-38 x 2,3-4,6  $\mu\text{m}$ ) a cinco septos (20-37 x 3,2-4,01  $\mu\text{m}$ ) y con célula basal en forma de cuña y apical puntiaguda (fig. 4) y clamidosporas pardas, globosas, intercalares, dispuestas en solitario o en cadena, de 8 a 13  $\mu\text{m}$ . De igual forma se observó la ausencia de microconidios, lo que coincide con lo señalado por Booth (1977), López *et al.* (1999) y Pierobom y Del Ponte (2011) para la especie *Fusarium semitectum* Berk. & Rav (sinonimia: *F. pallidoroseum*) (estado teleomorfo: no se conoce).

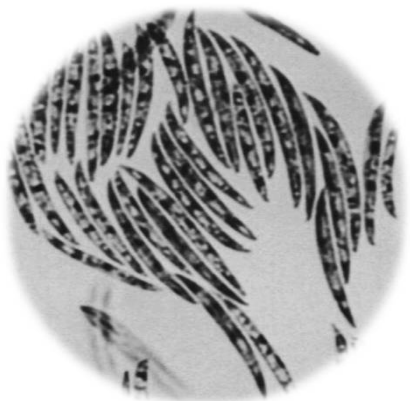


Figura 4. Macroconidios (x 750) de *F. semitectum* (Fuente: Booth, 1978).

Figure 4. Macroconidia (x 750) of *F. semitectum* (Source: Booth, 1978).

En los aislamientos No. 25 y No. 26 se observaron colonias de crecimiento rápido (de 56-77 mm de diámetro como promedio) sobre APD al séptimo día de incubación a 25°C. Los micelios aéreos se caracterizaron por su relativa abundancia y apariencia algodonosa, de color blanquecino en los cultivos jóvenes, y ocre y miel en los de mayor edad. La pigmentación del medio presentó una coloración naranja claro a salmón y se tornó algo pardusca finalmente (con un tono café). López y López (2004) obtuvieron un resultado similar con el empleo de los medios

The colonies of isolate No. 31 on PSA had floccose texture and showed white color initially, which became intense red in aged cultures. On the obverse of the dish a creamy yellow pigmentation was observed, and on the reverse it was brilliant red, wine red or meat red, which coincides with the report by Singh *et al.* (1991). On the other hand, in PDA a fast growth of the colonies was noticed (71-74 mm of diameter as average), when incubated for seven days at 25°C. The aerial mycelium was abundant, velvety, dusty, white in color, passing from rosy to crimson and formed concentric haloes (fig.5); the pigmentation of the middle was crimson and sometimes wine red. No sporodochia were observed. The primary conidiophores emerged laterally from the hyphae in the aerial mycelium, sometimes they varied from simple to branched; the secondary ones were less and highly branched. The microconidia were formed in false capitulum, fusiform, with one septum, and measured 4,0-16,3 x 1,7-3,7  $\mu\text{m}$ . The macroconidia were falciform, from three to five septa, somewhat curved, and measured 4,8-46,5 x 1,6-4,3  $\mu\text{m}$ . The chlamydospores were abundant, from globose to subglobose, had smooth walls, some with ornaments, of 6,8-16,3  $\mu\text{m}$ , some were in terminal position or intercalated, others formed chains; this description is in correspondence with the one provided by López (2003) for the species *Fusarium chlamydosporum* Wollenw & Reinking (teleomorphic state: unknown).

The cultural and morphological characterization of the ten studied isolates was concluded to allow the identification of five *Fusarium* species associated to the stored seeds of *L. leucocephala* cv. Peru, among which are: *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. incarnatum* and *F. chlamydosporum*, according to the evaluated traits. In addition, it is important to state that the second and fourth species are reported for the first time for this legume, and the others for the cultivar Peru.

--End of the English version--



de cultivos Agar Papa Sacarosa No. 1 y No. 3, donde también apreciaron esta misma coloración naranja salmón cerca del centro de la colonia, seguida de un tono café más intenso.

En cuanto a los caracteres morfológicos que más distinguieron estos aislamientos, se destacaron: la ausencia de esporodoquios y microconidios, y que los conidióforos que surgieron lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, al principio se presentaron simples y más tarde ramificados. Los macroconidios se caracterizaron por ser lanceolados, con tres a cinco septos generalmente, de 6,7-48 x 1,9-5,6  $\mu\text{m}$ , atenuados hacia ambos extremos, con una célula apical recta y muy atenuada, y una basal ligeramente papilada; las clamidosporas estaban esparcidas, aunque generalmente se encontraron intercaladas entre las hifas, solitarias y en pares, de globosas a subglobosas, con una pared lisa y un tamaño que osciló desde 5,5 hasta 9,5  $\mu\text{m}$ . De manera general, estos caracteres corroboran, en gran medida, los informados por López (2003) para la especie *Fusarium incarnatum* (Rob.) Sacc. (estado teleomorfo: no se conoce).

Las colonias del aislamiento No. 31 sobre APS fueron de textura flocosa y presentaron una coloración blanca inicialmente, la cual se tornó de color rojo intenso en cultivos envejecidos. En el anverso de la placa se pudo observar una pigmentación de color amarillo cremoso, y en el reverso esta fue rojo brillante, rojo vino o rojo carne, lo cual coincide con lo citado por Sing *et al.* (1991). Por otra parte, en APD se observó un crecimiento rápido de las colonias (de 71-74 mm de diámetro como promedio), cuando se incubaron durante siete días a 25°C. El micelio aéreo fue abundante, afelpado, polvoriento, de color blanco, el cual pasó por rosa hasta rojo carmín y formaba halos concéntricos (fig. 5); la pigmentación del medio fue de color rojo carmín y a veces rojo vino. No se observaron los esporodoquios. Los conidióforos primarios surgieron lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, en ocasiones variaron desde simples hasta ramificados; los secundarios se presentaron en menor cuantía y estaban muy ramificados. Los microconidios estaban formados en falsas



Figura 5. Colonia de *F. chlamydosporum* en APD al séptimo día de incubación.

Figure 5. Colony of *F. chlamydosporum* on PDA on the seventh day of incubation.

cabezuelas, fusiformes, con un septo, y medían 4,0-16,3 x 1,7-3,7  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios eran falciformes, de tres a cinco septos, algo curvados, y medían 4,8-46,5 x 1,6-4,3  $\mu\text{m}$ . Las clamidosporas eran abundantes, de globosas a subglobosas, de paredes lisas, algunas con ornamentos, de 6,8-16,3  $\mu\text{m}$ ; unas estaban en posición terminal o intercaladas, otras formaban cadenas; esta descripción se corresponde con lo señalado por López (2003) para la especie *Fusarium chlamydosporum* Wollenw & Reinking (estado teleomorfo: no se conoce).

Se concluye que la caracterización cultural y morfológica de los diez aislamientos en estudio permitió la identificación de cinco especies de *Fusarium* asociadas a las semillas almacenadas de *L. leucocephala* cv. Perú, entre las que se citan: *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. incarnatum* y *F. chlamydosporum*, de acuerdo con los caracteres evaluados. Además, es importante señalar que la segunda y la cuarta especie se informan por primera vez para esta leguminosa, y el resto para el cultivar Perú.

#### Referencias bibliográficas

- Arbeláez, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*. 17:11

- Booth, C. 1969. *Fusarium oxysporum*. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute (CAB) (Set 22). Kew, Surrey, England. No. 211. s/p
- Booth, C. 1977. *Fusarium*: laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute (CAB), Ferry Land, Kew, Surrey, England. 58 p.
- Booth, C. 1978. *Fusarium semitectum*. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute (CAB). Kew, Surrey, England. No. 573. s/p
- Borges, J. & Urdaneta, July. 2010. Efecto de *Fusarium* sp. en la germinación, fenología y supervivencia de plántulas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Agronomía Tropical*. 60 (2):155
- Delgado, A. *et al.* 1989. Estudio de la gomosis bacteriana en legumbres de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Pastos y Forrajes*. 12:127
- Dueñas, J.M. *et al.* 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad de la Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 11 (32):63. <http://www.utm.mx/temas/temas-docs/nota4t32.pdf>.
- Formiga, W. & Paz, M. 2009. Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Fusarium* sp. Curso Taxonomía de *Fusarium*. EMBRAPA. Recursos genéticos e biotecnología. Brasília-DF. [en línea] Disponible en: <http://fitopatologia1.blogspot.com/2010/10/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo.html#!/2010/10/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo.html>.
- Gerlach, W. & Nirenberg, Helgard. 1982. The genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 406 p.
- ISTA. 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*. Supplement. 27. 302 p.
- Lezcano, J.C. *et al.* 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. *Pastos y Forrajes*. 30(1):107
- López, Danay. 2003. Contribución al diagnóstico de las especies del género *Fusarium* Link. Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal. Mención Fitopatología. Universidad Agraria de La Habana. La Habana. Cuba. 61 p.
- López, Danay & López, María O. 2004. Influencia de diferentes tipos de agar y del sellado de las placas sobre la pigmentación y el crecimiento micelial de las especies de *Fusarium*. *Fitosanidad*. 8 (3):3
- López, Danay *et al.* 2004. Especies de *Fusarium* de Cuba sobre nuevos sustratos. *Revista Protección Vegetal*. 19 (1):14
- López, María O. *et al.* 1999. Manual para la identificación de los hongos fitopatógenos de la caña de azúcar en Cuba. *Acta Botánica Cubana*. 124:75
- Magani, E.I. *et al.* 2011. Integrated management of parasitic plant *Striga hermontica* in maize using *Fusarium oxysporum* (Mycoherbicide) and post-emergence herbicides in the Nigerian savanna. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14:731
- Moreno, J. *et al.* 1988. Evaluation of diseases of *Leucaena* species in the Cauca Valley, Colombia. *Leucaena Research Report*. 9:40
- Nelson, P. *et al.* 1983. *Fusarium* species. An Illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park, University Park and London.
- Ocom, Vanessa *et al.* 2011. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. *Ciência Rural*. 41 (2):193
- Pérez, V. *et al.* 2009. Reacción de clones naturales e híbridos de la FHIA de bananas y plátanos a las poblaciones de Cuba de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá. *Fitosanidad*. 13 (4):237
- Pierobom, C. & Del Ponte, M. 2011. *Fusarium*. Manual de sanidade de sementes. [en línea] Disponible en: <http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/sementes/procura.cgi>
- Pupo, Elsie & Heredia, Irma. 1998. Lista de hongos asociados a las semillas de *Leucaena leucocephala*. *Boletín técnico* (Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba). No. 1, p. 26
- Rayner, R.W. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England
- Singh, K. *et al.* 1991. An Illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Denmark. 133 p.