

Morphological characterization and histopathology of *Peronospora ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and seeds

Caracterización morfológica e histopatología de *Peronospora ciceris* en hojas y semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

Dagoberto Fierro-Corrales¹; Miguel Ángel Apodaca-Sánchez¹;
José Alberto Quintero-Benítez¹; Santos Gerardo Leyva-Mir²;
Jorge Luis Flores-Sánchez³; Juan Manuel Tovar-Pedraza^{3*}

¹Universidad Autónoma de Sinaloa, Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Protección Vegetal. Calle 16 Av. Japaraqui S/N, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, C.P. 81110, MÉXICO.

²Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. Carretera México-Texcoco km. 38.5, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Instituto de Fitosanidad, Fitopatología. Carretera México- Texcoco km. 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

Correo-e: jmtovar@colpos.mx (*Autor para correspondencia).

Abstract

Chickpea downy mildew is one of the most destructive diseases found sporadically in chickpea fields in the counties of Salvador Alvarado and Guasave, Sinaloa, Mexico. The aims of this study were to morphologically characterize the species of *Peronospora* causing downy mildew in chickpea, and to describe the histological changes induced by the pathogen in chickpea seeds and leaflets at different stages of infection (initial, intermediate and advanced). Samples of healthy and naturally-infected chickpea cv. "Blanco Sinaloa-92" leaflets and seeds were collected for morphological characterization of the pathogen and histological analysis. Cross-sections of leaflets and seeds were obtained with a manual rotary microtome and processed using the safranin-fast green differential staining technique. Morphological characterization indicated that *Peronospora ciceris* is the causative species of downy mildew symptoms in Sinaloa, Mexico. Histological evidence in leaflets with initial stages of infection showed palisade parenchyma with cell disruption, followed by hypertrophy and rupturing of cells. In addition, abundant coenocytic mycelial growth colonizing the vascular system and causing rupturing of the xylem vessels and phloem sieve tubes was observed. In leaflets with intermediate symptoms, the presence of intercellular mycelium, chloroplast degradation and loss of cell nuclei was detected. Leaflets with advanced symptoms exhibited damage in all tissues, showing massive cell destruction caused by extensive mycelial colonization in the epidermis, mesophyll, phloem and xylem. In seeds, intercellular mycelium was only observed in the embryonic cells.

Keywords: Downy mildew, oomycete, severity.

Resumen

El mildiu del garbanzo, es una de las enfermedades más destructivas que se ha encontrado esporádicamente en campos de garbanzo, localizados en los municipios de Salvador Alvarado y Guasave, Sinaloa, México. Los objetivos de este estudio fueron caracterizar morfológicamente a la especie de *Peronospora*, causante del mildiu del garbanzo; así como, describir los cambios histológicos que induce el patógeno en semillas y folíolos de garbanzo, con diferentes estados de infección (inicial, intermedia y avanzada). Muestras de folíolos y semillas de garbanzo cv. "Blanco Sinaloa-92", sanos e infectados naturalmente, se recolectaron para la caracterización morfológica del patógeno y su análisis histológico. Secciones transversales de folíolos y semillas se obtuvieron con un micrótopo de rotación manual y se procesaron mediante la técnica de tinción diferencial safranina verde-rápido. La caracterización morfológica indicó que *Peronospora ciceris*, es la especie causante de los síntomas de mildiu en Sinaloa, México. Los daños histológicos en folíolos con etapas iniciales de infección, mostraron parénquima en empalizada con desorganización celular, seguida por hipertrofia y rompimiento de células; además, se observó abundante crecimiento micelial cenocítico colonizando el sistema vascular y provocando rompimiento de los vasos del xilema y tubos cribosos del floema. En folíolos con síntomas intermedios, se detectó la presencia de micelio intercelular, degradación de cloroplastos y pérdida de núcleos celulares. Folíolos con síntomas avanzados exhibieron daño en todos los tejidos, observándose destrucción celular masiva, provocada por extensiva colonización micelial en epidermis, mesófilo, floema y xilema. En semillas, únicamente se observó micelio intercelular distribuido en las células embrionarias.

Palabras clave: Mildiu, oomicete, severidad.



Introduction

The chickpea (*Cicer arietinum* L.) is cultivated in about 50 countries and is the third most important legume in the world, after the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and pea (*Pisum sativum* L.). This is due to its high nutritional value, which has made it an integral part of the daily diet of millions of people (Knights et al., 2007).

During the 2012 cycle in Mexico, 137,861 and 17,476 ha were seeded with chickpea for grain and fodder respectively. The states of Sinaloa, Sonora, Guanajuato, Baja California Sur and Michoacán were the main producers of chickpea for grain. In this regard, the state of Sinaloa stands out because it accounted for approximately 70 % of national production in the autumn-winter cycle, with an average yield of 2.01 t·ha⁻¹ (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2013).

The gap between average and potential chickpea production is mainly due to the high incidence of disease and poor agricultural management. The main diseases affecting chickpea worldwide are: blight (*Ascochyta rabiei*), Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*), gray mold (*Botrytis cinerea*), dry root rot (*Rhizoctonia solani*), rust (*Uromyces ciceris arietini*), neck rot (*Sclerotium rolfsii*) and stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Chen, Sharma, & Muehlbauer, 2011; Ghosh, Sharma, Telangre, & Pande, 2013; Nene et al., 2012).

Chickpea production in Sinaloa is based on the production of quality grain, which has given it worldwide recognition. Much of this success is due to the production of varieties with features demanded by the international market, but also for their resistance to diseases originating in the soil. An example of these tolerant varieties is called Blanco Sinaloa-92, which has allowed the Mexican chickpea to be exported to more than 40 countries (Valenzuela-Herrera et al., 2012). However, this variety is highly susceptible to downy mildew, especially when there is high humidity and moderate temperatures (Salinas-Pérez, Cortez-Moncada, & Macías-Cervantes, 2008).

Downy mildews (order Peronosporales) are obligated biotrophic pathogens that cannot complete their life cycle without the presence of the host's living tissue, and they cannot be cultivated in axenic medium. Also, this group of pathogenic oomycetes is responsible for causing severe diseases in economically important crops (Webster & Weber, 2007).

In India, Agarwal, Kulshreshtha, Bhalla, and Sarbhoy (2003) described for the first time *Peronospora ciceris* as the causal agent of chickpea downy mildew. However, the disease had already appeared in Israel and Mexico in the late 70's (Nene, 1980). In Mexico, chickpea

Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es cultivado en aproximadamente 50 países y es la tercer leguminosa más importante en el mundo, después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el chícharo (*Pisum sativum* L.). Lo anterior se debe a su alto valor nutricional, ya que es parte integral de la dieta diaria de millones de personas (Knights et al., 2007).

Durante el ciclo 2012, en México se sembraron 137,861 y 17,476 ha de garbanzo para grano y forraje respectivamente. Los estados de Sinaloa, Sonora, Guanajuato, Baja California Sur y Michoacán, fueron los principales productores de garbanzo para grano. Destacando que en el estado de Sinaloa se concentró aproximadamente el 70 % de la producción nacional durante el ciclo otoño-invierno, con un rendimiento promedio de 2.01 t·ha⁻¹ (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2013).

La diferencia entre la producción promedio y potencial del garbanzo, se debe principalmente a la alta incidencia de enfermedades y pobre manejo agronómico. Las principales enfermedades que afectan al garbanzo a nivel mundial son: tizón (*Ascochyta rabiei*), marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*), moho gris (*Botrytis cinerea*), pudrición seca de raíz (*Rhizoctonia solani*), roya (*Uromyces ciceris arietini*), pudrición del cuello (*Sclerotium rolfsii*) y pudrición de tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Chen, Sharma, & Muehlbauer, 2011; Ghosh, Sharma, Telangre, & Pande, 2013; Nene et al., 2012).

La producción de garbanzo en Sinaloa, se basa en la producción de grano de calidad, lo que le ha dado reconocimiento a nivel mundial. Gran parte de este éxito, se debe a la producción de variedades con características que demanda el mercado internacional, pero también por su resistencia a enfermedades con origen en el suelo. Un ejemplo, de estas variedades tolerantes, es la denominada Blanco Sinaloa-92, que ha permitido que el garbanzo mexicano se exporte a más de 40 países (Valenzuela-Herrera et al., 2012). Sin embargo, esta variedad es altamente susceptible a mildiu, principalmente cuando existe alta humedad ambiental y temperatura moderada (Salinas-Pérez, Cortez-Moncada, & Macías-Cervantes, 2008).

Los mildius (orden Peronosporales) son patógenos biotróficos obligados, que para completar su ciclo de vida requieren la presencia de tejido vivo del hospedante, además de no ser cultivados en medio axénico. Asimismo, este grupo de oomicetes patógenos, es responsable de causar severas enfermedades en cultivos de gran importancia económica (Webster & Weber, 2007).

En India, Agarwal, Kulshreshtha, Bhalla, y Sarbhoy (2003) describieron por primera vez a *Peronospora ciceris*,

downy mildew has been detected sporadically ever since the first outbreak occurred in Sinaloa and Baja California during the 1996-1997 cycle, with *Peronospora* sp. reported as the causal agent (Carrillo-Fasio, Allende-Molar, & García-Estrada, 2012).

Symptoms of the disease, called downy mildew, occur in chickpea leaflets in the form of light green spots, which are diffuse at the beginning. Subsequently, the infection progresses on the leaflet irregularly and acquires a dull yellow color. If the conditions of temperature (20 - 24 °C) and humidity (> 85 %) are favorable for its development, fungal growth with a hairy and dark appearance can be seen on the underside of the leaf (Carrillo-Fasio et al., 2012).

Globally, no histopathological studies describing the damage induced by the causal agent of chickpea downy mildew have been published. Moreover, in Mexico there is no taxonomic confirmation of which species of *Peronospora* causes this disease. Therefore, this study was conducted in order to morphologically characterize the causal agent of chickpea downy mildew and determine the histological and cellular changes induced by this oomycete in both chickpea seeds and leaflets with different levels of infection.

Materials and methods

Plant material

Samples of leaflets and seeds (500 g) of chickpea cv. "Blanco Sinaloa-92," both healthy and with presence of downy mildew symptoms, were collected in several lots in Valle del Fuerte and Évora, Sinaloa (Figure 1).

Leaflet samples were grouped according to the severity level of symptoms corresponding to different stages of downy mildew infection on each leaflet. The severity scale was established as follows: a) healthy leaflet: no symptoms of the disease, b) leaflet with initial symptoms: presents ovoid or round pale-green spots (1 - 10 % severity), c) leaflet with intermediate symptoms: chlorotic spots (11 - 40 % severity), d) leaflet with advanced symptoms: in this stage of disease development, the leaflets have brown to black spots, and their tissue is necrotic (> 41%). In the initial and intermediate symptoms, the presence of the fungus sporulating on the surface of the infected leaflets was observed (Figure 2).

Morphological characterization

To carry out the quantitative and qualitative characterization of the reproductive structures of the fungus (sporangiofores and sporangia), 10 chickpea leaflets with abundant *Peronospora* sp. sporulation

como el agente causal de mildiu del garbanzo. Sin embargo, esta enfermedad ya se había presentado en Israel y México a finales de los años 70's (Nene, 1980). En México, el mildiú del garbanzo se ha detectado de manera esporádica, a partir del primer brote epidémico ocurrido en Sinaloa y Baja California durante el ciclo 1996-1997, reportando como el agente causal a *Peronospora* sp. (Carrillo-Fasio, Allende-Molar, & García-Estrada, 2012).

Los síntomas de la enfermedad, denominada mildiu, se presentan en folíolos de garbanzo en forma de manchas verde claro, las cuales son difusas al inicio. Posteriormente, la infección avanza sobre el folíolo en forma irregular y adquiere color amarillo opaco. Si las condiciones de temperatura (20 - 24 °C) y humedad (> 85 %) son favorables para su desarrollo se puede observar, por el envés de la hoja, crecimiento fungoso con apariencia vellosa y de color oscuro (Carrillo-Fasio et al., 2012).

A nivel mundial, no existen estudios histopatológicos que describan los daños inducidos por el agente causal del mildiu del garbanzo. Además, en México no existe confirmación taxonómica, de cuál es la especie de *Peronospora* causante de esta enfermedad. Por lo anterior, este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar morfológicamente al agente causal del mildiu de garbanzo, así como determinar los cambios histológicos y celulares inducidos por este oomicete, tanto semillas como folíolos de garbanzo con diferentes niveles de infección.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron muestras de folíolos y semillas (500 g) de garbanzo cv. "Blanco Sinaloa-92" sanas y con presencia de síntomas de mildiu, en varios lotes del Valle del Fuerte y Évora, Sinaloa (Figura 1).

Las muestras de folíolos se agruparon de acuerdo al nivel de severidad de síntomas, correspondientes a diferentes etapas de infección del mildiu en cada folíolo. La escala de severidad se estableció de la siguiente manera: a) folíolo sano: no presenta síntomas de la enfermedad, b) folíolo con síntomas iniciales: presenta manchas ovoides o redondas de color verde-pálido (1 - 10 % de severidad), c) folíolo con síntomas intermedios: manchas cloróticas (11 - 40 % de severidad), d) folíolo con síntomas avanzados: en este estado de desarrollo de la enfermedad, los folíolos presentan manchas de color café a negras, su tejido se encuentra necrótico (> 41 %). En los síntomas iniciales e intermedios se observó la presencia del hongo esporulando sobre la superficie de los folíolos infectados (Figura 2).

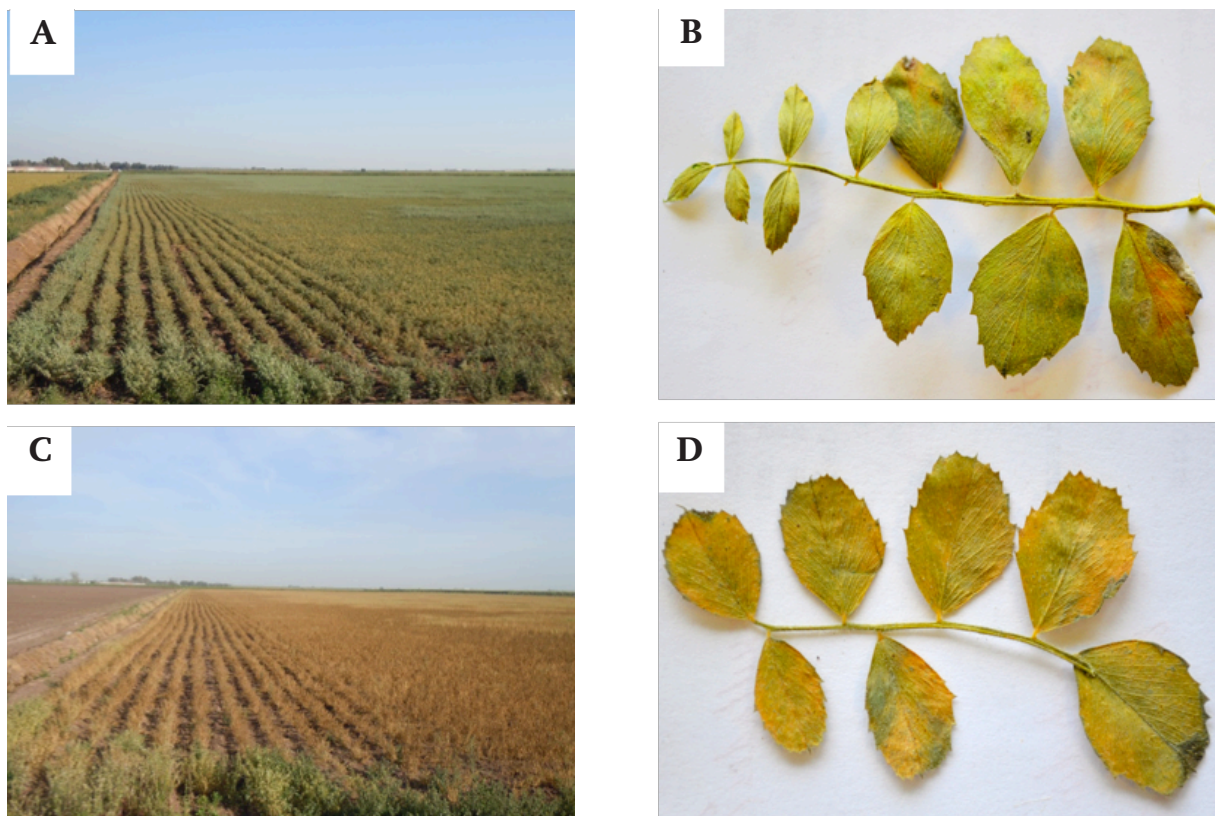


Figure 1. Plots and tissues of chickpea cv. "Blanco Sinaloa-92" with different downy mildew symptom levels. (A and B) Intermediate severity level, (C and D) advanced severity level.

Figura 1. Parcelas y tejidos de garbanzo cv. "Blanco Sinaloa-92" con diferente nivel de síntomas de mildiu. (A y B) Nivel intermedio de severidad, (C y D) nivel avanzado de severidad.

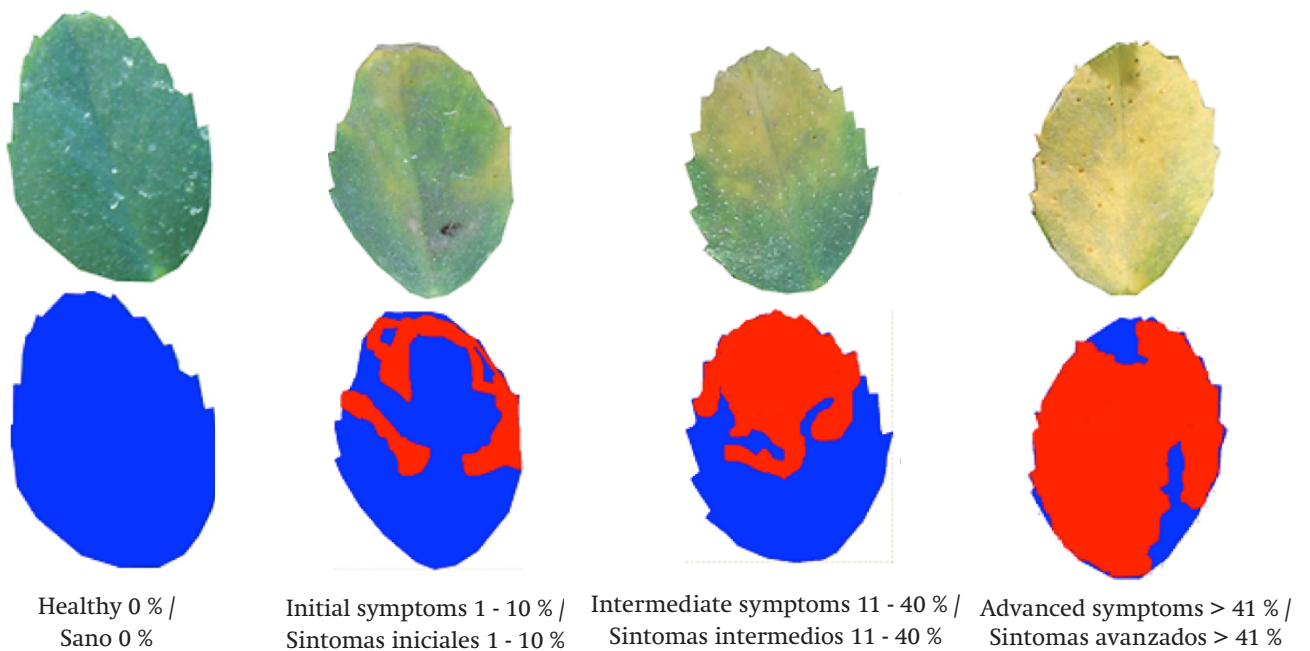


Figure 2. Logarithmic diagrammatic scale of mildew severity levels in naturally-infected chickpea cv. "White Sinaloa-92" leaflets.

Figura 2. Escala logarítmica diagramática de niveles de severidad de mildiu en folíolos del garbanzo cv. "Blanco Sinaloa-92" infectados naturalmente.

were fixed in Carnoy's solution (96 % ethyl alcohol and glacial acetic acid, 1:1) in 50-mL amber vials; they were placed uncovered in a Kitasato flask and the air inside the leaflets was displaced with a vacuum pump; the Carnoy's solution was infiltrated properly. The vials were kept capped at room temperature (20-25 °C) for six months until the Carnoy's solution had extracted the chlorophyll from the tissues; this process enabled adequate observation of the samples under a compound microscope (34936 Ultraphot II, Carl Zeiss®, Germany). Of the leaflets fixed in Carnoy's solution, nine were randomly selected, each arranged on a slide with lactofenol and a coverslip placed on top of it. The counting of sporangiophores emerging from a stoma and the morphometric characterization of 100 sporangia were performed using the compound microscope at a magnification of 40 X, thoroughly examining each leaflet. At the same time as the sporangiophore count, the search for oospores embedded among the intercellular spaces of the chickpea leaflet tissue was also conducted.

Leaflet preparation for histological studies

Samples of leaflets, at each stage of infection, were fixed in FAA solution (formaldehyde [100 mL], glacial acetic acid [50 mL], absolute ethanol [50 mL] and distilled water [350 mL]), where they remained for at least 24 h. After the fixation time, the samples were washed with tap water for 30 to 60 min. The samples were dehydrated using an automatic tissue processor (Tissue-Tek II, model 4640-B, Sakura Finetechnical®, Japan), where they passed through ethyl alcohol solutions (50, 70, 96 and 100 %), followed by a change to absolute ethanol-xylene (1:1), two changes of pure xylene and one in paraplast (SIGMA Chemical®, USA); tissues were kept for 3 h in each solution.

Inclusion of the tissues consisted of embedding the samples in cubic bond paper molds, pre-filled with molten paraplast; the tissues were oriented in both a cross and paradermal plane. The paraplast cubes were fixed in wooden blocks (2 x 1 x 3 cm) and mounted in a manual rotary microtome (Spencer 820, American Optical®, USA), where paradermal and cross cuts of 8 µm in thickness were made; subsequently, the cut strips were placed in a water bath (60 °C water plus 3 % gelatin) and mounted on slides.

The sections were stained using the safranin-fast green differential staining technique described by Leyva-Mir, Cárdenas-Soriano, Tovar-Pedraza, Huerta-Espino, and Villaseñor-Mir (2012) with some modifications, which began with dewaxing the cuts in three changes of xylene (3 min in each one), after which they were hydrated with a graded ethyl alcohol series (100, 96, 70 and 50 %) for 3 min each. Staining in 1 % safranin (prepared in 50 % ethyl alcohol) was performed for 3 h, and then the sections

Caracterización morfológica

Para llevar a cabo la caracterización cuantitativa y cualitativa de las estructuras reproductivas del hongo (esporangióforos y esporangios), se fijaron, 10 folíolos de garbanzo con esporulación abundante de *Peronospora* sp., en solución de Carnoy's (alcohol etílico 96 % y ácido acético glacial, 1:1) en frascos de color ámbar de 50 mL; éstos se colocaron destapados dentro de un matraz Kitasato y con bomba de vacío se desplazó el aire del interior de los folíolos; la solución de Carnoy's se infiltró adecuadamente. Los frascos se conservaron tapados a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante seis meses, hasta que la solución de Carnoy's clarificó los tejidos, por eliminación de la clorofila; este proceso permitió la observación adecuada de las muestras bajo el microscopio compuesto (34936 Ultraphot II, Carl Zeiss®, Alemania). De los folíolos fijados en Carnoy's, se seleccionaron nueve al azar, cada uno se arregló en un portaobjeto con lactofenol y se les colocó un cubreobjetos. El conteo de esporangióforos, emergiendo por estoma y la caracterización morfométrica de 100 esporangios, se realizó con la ayuda de un microscopio compuesto a una magnificación de 40 X, revisando completamente cada folíolo. Simultáneamente al conteo de esporangióforos, también se llevó a cabo la búsqueda de oosporas incrustadas entre los espacios intercelulares, del tejido de los folíolos de garbanzo.

Preparación de folíolos para estudios histológicos

Muestras de folíolos, de cada estado de infección, se fijaron en solución FAA (formaldehído [100 mL], ácido acético glacial [50 mL], etanol absoluto [50 mL] y agua destilada [350 mL]), en donde permanecieron, mínimamente, por 24 h. Transcurrido el tiempo de fijación, las muestras se lavaron con agua corriente, de 30 a 60 min. La deshidratación de las muestras se realizó con un procesador automático de tejidos (Tissue-Tek II, modelo 4640-B, Sakura Finetechnical®, Japón), en donde se pasaron por soluciones de alcohol etílico (50, 70, 96 y 100 %), seguido por un cambio a etanol absoluto-xileno (1:1), dos cambios de xileno puro y uno en paraplast (SIGMA Chemical®, EE.UU.); los tejidos se mantuvieron por 3 h en cada solución.

La inclusión de los tejidos, consistió en embeber las muestras en moldes cúbicos de papel bond, previamente llenados con paraplast fundido, los tejidos se orientaron en plano transversal y paradermal. Los cubos de paraplast se fijaron en piezas de madera (2 x 1 x 3 cm) y se montaron en un micrótopo de rotación manual (Spencer 820, American Optical®, EE.UU.), en donde se realizaron cortes paradermales y transversales de 8 µm de grosor; posteriormente, las tiras de cortes se colocaron en baño de flotación (agua a 60 °C más 3 % gretina) y se montaron en portaobjetos.

were dehydrated in an ethyl alcohol series of 50, 70 and 96 % (3 min in each one) and stained with fast green (Técnica Química®, Mexico) at 1 % (prepared in 96 % ethyl alcohol) for 30 s; then they were washed and dehydrated by being passing through ethyl alcohol at 96 and 100 % for 3 min in each one. Finally, the stained sections were passed through three changes of xylene (3 min in each one) and covered with synthetic resin and coverslips.

Out of a total of 30 randomly-selected leaflets fixed in FAA solution, 80 permanent preparations stained with safranin-fast green were obtained. The preparations were analyzed in detail under a compound microscope (34936 Ultraphot II, Carl Zeiss®, Germany).

Seed preparation for histological studies

The seeds were selected by color: normal and dark brown. Of the dark brown seeds, 10 were taken randomly and included in paraffin, following the same procedure used to include the chickpea leaflets in paraffin, but in this case the grains remained for 5 h in each change and were cut at 12- μ m thickness. The histological seed sections were stained with safranin-fast green, according to the methodology described for leaflets. Finally, the preparations were examined systematically using a compound microscope.

Results and discussion

Morphological characterization

The preparations examined under light microscopy showed that the sporangiophores emerging from each stoma were arranged in fascicles (1 - 7), measured from 149.9 - 471.7 x 60 - 276.7 μ m (most often occurring in the range from 210 - 330 x 100 - 200 μ m) and branched dichotomically from two to ten times (most often appearing with five to six branches) (Figure 3 A and B). The terminal branches were acute to sub-acute, ending in rounded tips (Figure 3 C). The sporangia were ovoid to sub-elliptic, hyaline, and 21.87 - 34.99 x 13.8 - 24.54 μ m, with a granular, thin-walled and smooth cytoplasm (Figure 3 D), whereas the mycelia were coenocytic, filiform and distributed intercellularly within the mesophyll. All morphological characters and measurement ranges agreed with those reported by Agarwal et al. (2003) for *Peronospora ciceris*.

It is important to note that morphological characterization is a reliable tool for identifying *Peronospora ciceris*, as demonstrated by Agarwal et al. (2003), who made a comparison between the morphological characters presented by different *Peronospora* spp. related to *Peronospora ciceris*, which can be differentiated by more than one morphological character (length, number of conidiophore branches and the shape and size of sporangia and oospores).

Los cortes se tiñeron, mediante la técnica de tinción diferencial safranina-verde rápido descrita por Leyva-Mir, Cárdenas-Soriano, Tovar-Pedraza, Huerta-Espino, y Villaseñor-Mir (2012) con algunas modificaciones, para lo cual se inició con la desparafinación de los cortes en tres cambios de xileno (3 min en cada uno), después se hidrataron con una serie gradual de alcohol etílico (100, 96, 70 y 50 %) por 3 min cada uno. La tinción en safranina al 1 % (preparada en alcohol etílico al 50 %) se realizó por 3 h, después los cortes se deshidrataron en una serie de alcohol etílico al 50, 70 y 96 % (3 min en cada uno) y tiñeron con verde rápido (Técnica Química®, México) al 1 % (preparada en alcohol etílico al 96 %) por 30 s; enseguida se lavaron y deshidrataron pasándolos por alcohol etílico al 96 y 100 %, por 3 min en cada uno. Finalmente, las secciones teñidas se pasaron por tres cambios de xileno (3 min en cada uno) y se cubrieron con resina sintética y cubreobjetos.

De un total de 30 foliolos fijados en solución FAA tomados al azar, se obtuvieron 80 preparaciones permanentes teñidas con safranina-verde rápido. Las preparaciones se analizaron detalladamente en un microscopio compuesto (34936 Ultraphot II, Carl Zeiss®, Alemania).

Preparación de semillas para estudios histológicos

Las semillas se seleccionaron por color: café normal y oscuro. De las semillas color café oscuro se tomaron 10 al azar y se incluyeron en parafina, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para incluir en parafina a los foliolos de garbanzo, pero en este caso los granos permanecieron 5 h en cada cambio y se cortaron a 12 μ m de grosor. Los cortes histológicos de semillas se tiñeron con safranina-verde rápido, de acuerdo a la metodología descrita para foliolos. Finalmente, las preparaciones se examinaron sistemáticamente usando un microscopio compuesto.

Resultados y discusión

Caracterización morfológica

Las preparaciones examinadas bajo microscopía de luz, mostraron que los esporangióforos que emergen por cada estoma, estuvieron dispuestos en fascículos (1 - 7), miden de 149.9 - 471.7 x 60 - 276.7 μ m (repetiéndose en mayor frecuencia 210 - 330 x 100 - 200 μ m) y ramificados dicotómicamente de dos a diez veces (presentándose con mayor frecuencia cinco a seis ramificaciones) (Figura 3 A y B). Las ramificaciones terminales fueron de agudas a sub-agudas, terminando las puntas en forma redondeada (Figura 3 C). Esporangios ovoides a sub-elípticos, hialinos, 21.87 - 34.99 x 13.8 - 24.54 μ m, con citoplasma granular,

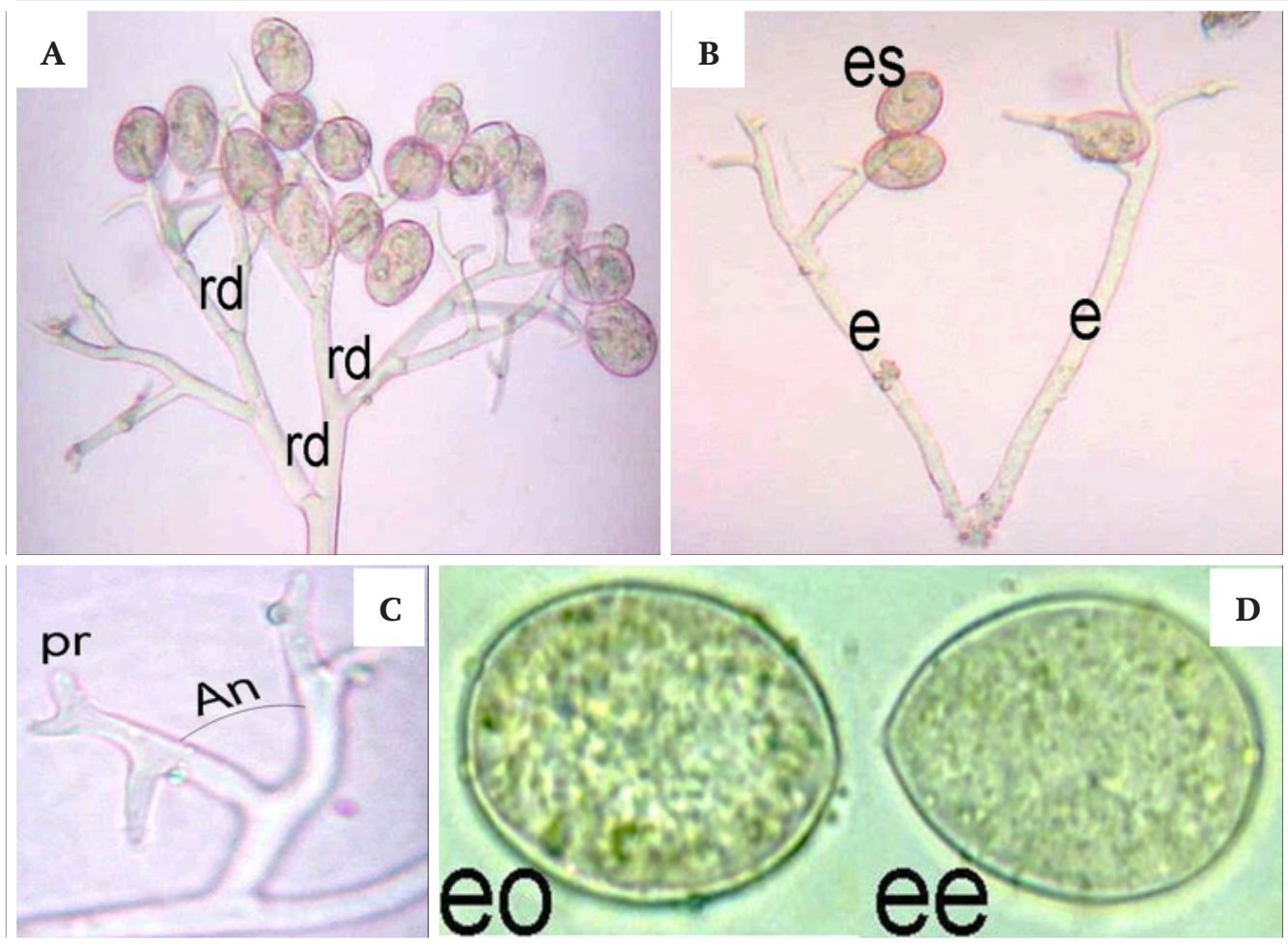


Figure 3. Reproductive structures and infection of *Peronospora ciceris* in chickpea leaflets. (A) Sporangiphore showing dichotomous branching (rd) and sporangia. (B) Sporangiphore (e) with sporangia (es). (C) Terminal branching of a sporangiphore showing a rounded tip (pr) and acute angle (w). (D) Ovoid (eo) and sub-elliptical (ee) sporangium.

Figura 3. Estructuras de reproducción e infección de *Peronospora ciceris* en folíolos de garbanzo. (A) Esporangióforo mostrando ramificaciones dicotómicas (rd) y esporangios. (B) Esporangióforo (e) con esporangios (es). (C) Ramificación terminal de un esporangióforo mostrando punta redondeada (pr) y ángulo agudo (an). (D) Esporangio ovoide (eo) y sub-elíptico (ee).

Anatomical description of healthy tissues

Healthy leaflets had an adaxial and abaxial epidermis formed by a layer of cells, usually tubular in a horizontal direction, apparently without chloroplasts (Figure 4 A). A large number of stomata were observed, but it was not possible to see the cuticle. The palisade parenchyma is constituted by four to five layers of vertically-arranged cells; these cells have a central nucleus and a large number of chloroplasts. The spongy parenchyma is composed of two to three layers of irregularly-shaped or almost round cells. Similarly, these cells showed a nucleus and abundant chloroplasts; the xylem was made up of large conducting vessels oriented towards the adaxial epidermis, and the phloem by sieve tubes oriented towards the abaxial epidermis.

pared delgada y lisa (Figura 3 D). Micelio cenocítico, filiforme y distribuido intercelularmente dentro del mesófilo. Todas las características morfológicas y rangos de medidas coincidieron con las reportadas por Agarwal et al. (2003) para *Peronospora ciceris*.

Es importante indicar que, la caracterización morfológica es una herramienta confiable para la identificación de *Peronospora ciceris*, tal y como lo demostraron Agarwal et al. (2003), quienes realizaron una comparación, entre los caracteres morfológicos que presentan diversas *Peronospora* spp. relacionadas a *Peronospora ciceris*, las cuales se pueden diferenciar por más de un carácter morfológico (longitud, número de ramificaciones del conidióforo, así como la forma y tamaño de los esporangios y oosporas).

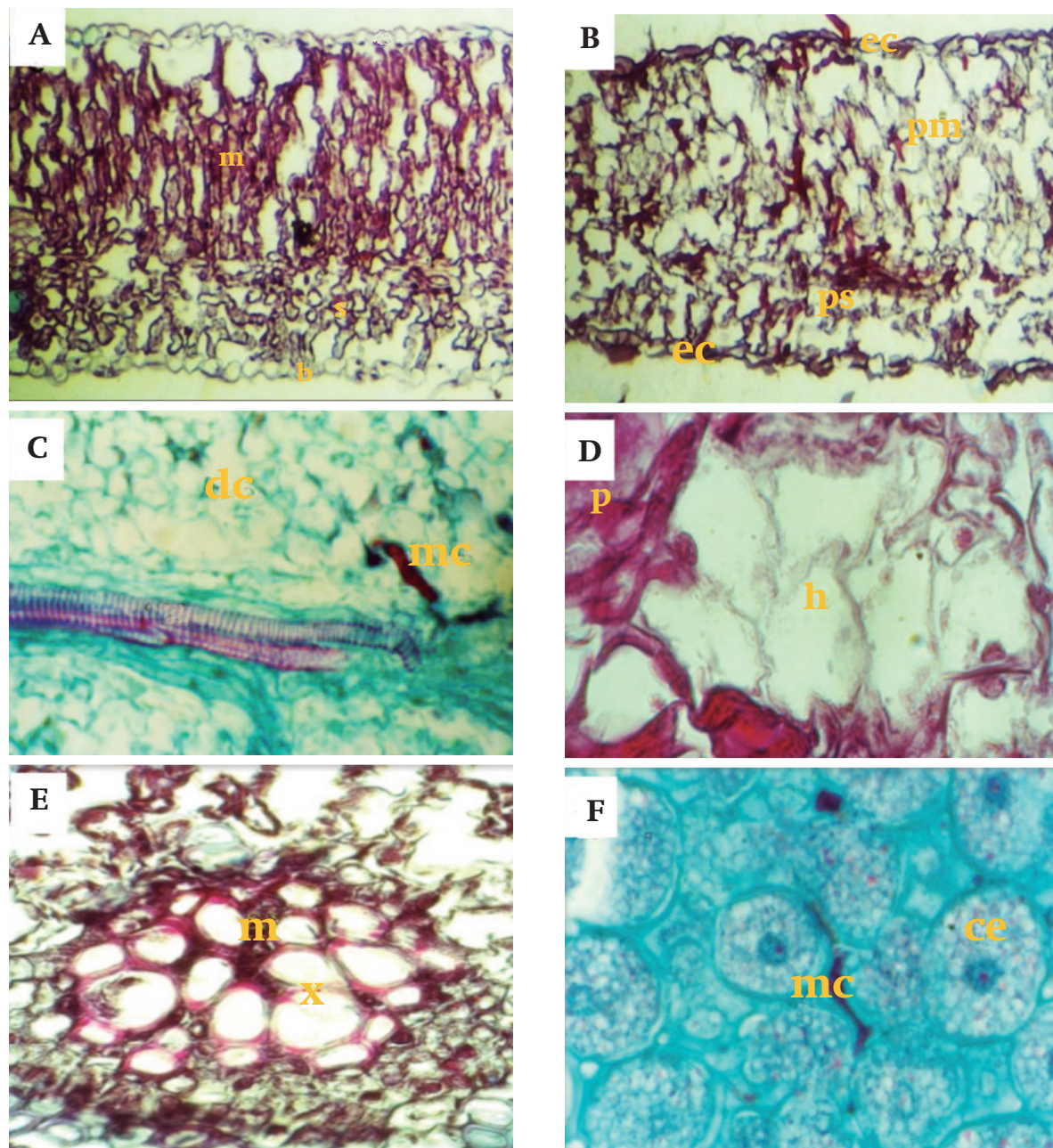


Figure 4. Photomicrographs of cross and paradermal sections of healthy and *Peronospora cicieris*-infected chickpea leaflets and seeds. (A) Cross-section of a healthy leaflet showing adaxial (a) and abaxial (b) epidermis. (B) Cross-section of an infected leaflet showing collapsed epidermis (ec) and disruption of palisade parenchyma (pm) and spongy parenchyma (ps) cells. (C) Coenocytic mycelium (mc) growing intercellularly causing cell disruption (dc). (D) Accumulation of polyphenols (p), hypertrophy (h) and cell rupturing. (E) Paradermal section of an infected leaflet showing coenocytic mycelium growing in xylem. (F) Cross-section of an infected seed, showing coenocytic mycelium developing intercellularly through embryonic cells (ce).

Figura 4. Fotomicrografías de secciones transversales y paradermales de folíolos y semillas de garbanzo sanas e infectadas por *Peronospora cicieris*. (A) Sección transversal de un folíolo sano mostrando epidermis adaxial (a) y abaxial (b). (B) Sección transversal de un folíolo infectado mostrando epidermis colapsada (ec) y desorganización de células del parénquima en empalizada (pm) y del parénquima esponjoso (ps). (C) Micelio cenocítico (mc) creciendo intercelularmente ocasionando desorganización celular (dc). (D) Acumulación de polifenoles (p), hipertrofia (h) y rompimiento celular. (E) Sección paradermal de folíolo infectado mostrando micelio cenocítico creciendo en xilema. (F) Corte transversal de una semilla infectada, mostrando micelio cenocítico desarrollándose intercelularmente a través de las células embrionarias (ce).

Histological alterations in naturally-infected leaflets

Infected leaflet sections with initial symptoms showed cell disruption of the mesophyll (Figure 4 B) due to the presence of mycelia in this plant organ. In chickpea leaflet sections with intermediate symptoms, the presence of intercellular mycelium (Figure 4 C), collapse of the epidermis (adaxial and abaxial), degradation of a large number of chloroplasts, loss of cell nuclei, phenol accumulation, cell necrosis and hyperplasia in some cells were detected (Figure 4 D). Some of these changes and accumulation of phenolic compounds were recorded by Reuveni and Cohen (1978) in tobacco plants infected by *P. tabacina*. Also, accumulation of phenolic compounds, lignification and callus deposition have been described for many systemic mildews (Mauch-Mani, 2002).

In leaflet sections with advanced symptoms, damage caused by *P. ciceris* mycelium was easily found throughout the leaf, showing massive destruction of host cells, both in the epidermis (abaxial and adaxial) and in the mesophyll and vascular bundles (Figure 4 E), causing a rupture in the xylem vessels and phloem sieve tubes, which probably caused the blockage of liquids, as well as of nutrients, and therefore rapid necrosis of the leaflets. This coincides with the findings of Milholland, Papadopoulou, and Daykin (1981), who found *P. tabacina* intercellular mycelium growing through the cambium, xylem and phloem of systemically-infected tobacco plants. For their part, Wehtje and Zimmer, in 1978, found *Plasmopara halstedii* mycelium colonizing the vascular bundles of experimentally-infected sunflower seedlings.

No oospores were observed in chickpea leaflets under either of the two techniques developed for this purpose: leaflets fixed in Carnoy's solution and in FAA solution included in paraffin; this contrasts with the results of Agarwal et al. (2003), who reported the presence of *P. ciceris* oospores in chickpea leaflets. This suggests that *P. ciceris* is possibly heterothallic, and that in the region under study it failed to form oospores for its survival as indicated by Smith and Price in 1997 for *Hyaloperonospora parasitica*.

Histological alterations in naturally-infected seeds

Our histological evidence showed mycelium distributed intercellularly in the seed embryo (Figure 4 F), coinciding with the findings of Adenle and Cardwell (2000), who reported the presence of mycelium in the embryo of maize seeds infected by *Peronosclerospora sorghi*, whereas Shetty, Mathur, and Neergaard (1980) recorded latent mycelium of *Sclerospora graminicola* in embryos of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) seeds.

Several histological studies have reported the presence of *Peronospora* spp. oospores embedded in the cover

Descripción anatómica de tejidos sanos

Los folíolos sanos presentaron epidermis adaxial y abaxial constituidas por una capa de células, generalmente tubulares en sentido horizontal, aparentemente sin cloroplastos (Figura 4 A). Se observó gran cantidad de estomas, sin embargo no fue posible observar la cutícula; el parénquima de empalizada se encuentra constituido por cuatro a cinco capas de células organizadas de forma vertical; estas células presentan núcleo central y gran número de cloroplastos; el parénquima esponjoso se encontró constituido por dos a tres capas de células de forma irregular o casi redondas. De igual forma, estas células presentaron un núcleo y abundantes cloroplastos; el xilema se observó constituido de vasos conductores grandes orientados hacia la epidermis adaxial; y el floema por tubos cribosos orientados hacia la epidermis abaxial.

Alteraciones histológicas en folíolos infectados naturalmente

Secciones de folíolos infectados, con síntomas iniciales, mostraron desorganización celular del mesófilo (Figura 4 B), debido a la presencia de micelio en este órgano de la planta. En secciones de folíolos de garbanzo con síntomas intermedios, se detectó la presencia de micelio intercelular (Figura 4 C), colapso de la epidermis (adaxial y abaxial), degradación de un gran número de cloroplastos, pérdida de núcleos celulares, acumulación de fenoles, necrosis celular e hiperplasia en algunas células (Figura 4 D). Algunas de estas alteraciones y la acumulación de compuestos fenólicos, fueron registrados por Reuveni y Cohen (1978), en plantas de tabaco infectadas por *P. tabacina*. Asimismo, la acumulación de compuestos fenólicos, lignificación y deposición de callos han sido descritos para muchos mildiús sistémicos (Mauch-Mani, 2002).

En las secciones de folíolos con síntomas avanzados, se encontró fácilmente el daño provocado por el micelio de *P. ciceris* a través de toda la hoja, observándose destrucción masiva de las células del hospedante tanto en epidermis (abaxial y adaxial), como en el mesófilo y en los haces vasculares (Figura 4 E), provocando un rompimiento en los vasos del xilema y tubos cribosos del floema; lo que probablemente provocó la obstrucción de líquidos, además de nutrientes, y por consiguiente, una rápida necrosis de los folíolos. Lo anterior coincide con Milholland, Papadopoulou, y Daykin (1981), quienes encontraron micelio intercelular de *P. tabacina* creciendo a través del cambium, xilema y floema de plantas de tabaco infectadas sistémicamente. Por su parte, Wehtje y Zimmer en 1978, encontraron micelio de *Plasmopara halstedii* colonizando los haces vasculares de plántulas de girasol infectadas experimentalmente.

of beet, pea and soybean seeds (Agarwal et al., 2006; Roongruangsree, Olson, & Lange, 1988), which act as survival structures during adverse conditions; they also represent the source of primary inoculum, which causes the systemic invasion in seedlings at the beginning of the next cycle, which begins with the epidemic's development in the field (Adenle & Cardwell, 2000; Agarwal et al., 2006; Singh & Mathur, 2004). However, in this study the presence of *P. ciceris* oospores in seeds was not detected, confirming the observations of Agarwal et al. (2003), who only noted the formation of oospores in chickpea leaflets. Also, studies conducted by Van der Gaag, Frinking, and Geerds (1993) showed oospores of *P. vicia* f. sp. *fabae* in all the aerial parts of bean plants, except seeds. This reinforces our belief that *P. ciceris* is heterothallic, and that in the region under study it was unable to form oospores for its survival, and thus the only way to do so would be as mycelium in the seed as reported by Sugha, Develash, Singh, Thakur, and Tyagi (1996), for the case of *Peronospora destructor*.

Conclusions

The morphological characters of the oomycete causing downy mildew symptoms in Sinaloa, Mexico, corresponded to those described for *Peronospora ciceris*. To the best of our knowledge, this is the first histopathological study showing a large part of the process of mycelial colonization and histological alterations induced by *P. ciceris* in the epidermis, mesophyll, phloem and xylem of leaflets, as well as in embryonic cells of chickpea seeds. These histological data can be used as a component in future studies aimed at evaluating various strategies for managing the disease.

No se observaron oosporas en los foliolos de garbanzo, bajo ninguno de los dos métodos establecidos para este propósito: foliolos fijados en solución Carnoy's y en solución FAA incluidos en parafina; lo cual contrasta con los resultados de Agarwal et al. (2003), quienes reportaron la presencia de oosporas de *P. ciceris* en foliolos de garbanzo. Lo anterior sugiere que *P. ciceris* posiblemente sea heterotálico, y que en la región en estudio no logró formar oosporas para su supervivencia tal y como lo indicaron Smith y Price en 1997 para *Hyaloperonospora parasitica*.

Alteraciones histológicas en semillas infectadas naturalmente

Nuestras evidencias histológicas mostraron micelio distribuido intercelularmente en el embrión de la semilla (Figura 4 F), coincidiendo con Adenle y Cardwell (2000), quienes reportaron la presencia de micelio en el embrión de semillas de maíz, infectadas por *Peronosclerospora sorghi*. Mientras que, Shetty, Mathur, y Neergaard (1980), registraron micelio latente de *Sclerospora graminicola* en embriones de semillas de mijo perla (*Pennisetum glaucum*).

Diversos estudios histológicos han reportado la presencia de oosporas de *Peronospora* spp., incrustadas en la cubierta de semillas de betabel, chícharo y soya (Agarwal et al., 2006; Roongruangsree, Olson, & Lange, 1988), las cuales actúan como estructuras de supervivencia durante condiciones adversas; además de que representan la fuente de inóculo primario, que causará la invasión sistémica en plántulas al inicio del siguiente ciclo, lo cual comenzará con el desarrollo de la epidemia en campo (Adenle & Cardwell, 2000; Agarwal et al., 2006; Singh & Mathur, 2004). Sin embargo, en este trabajo no se logró registrar la presencia de oosporas de *P. ciceris* en semillas, confirmando las observaciones de Agarwal et al. (2003), quienes únicamente señalaron la formación de oosporas en foliolos de garbanzo. También, los estudios conducidos por Van der Gaag, Frinking, y Geerds (1993), mostraron oosporas de *P. vicia* f. sp. *fabae* en todas las partes aéreas de plantas de haba, excepto en semillas. Lo anterior nos hace creer nuevamente que *P. ciceris* sea heterotálico, y que en la región en estudio no logró formar oosporas para su supervivencia, la única manera de hacerlo sería en forma de micelio en la semilla tal y como lo reportaron Sugha, Develash, Singh, Thakur, y Tyagi (1996), para el caso de *Peronospora destructor*.

Conclusiones

Las características morfológicas del oomicete causante de los síntomas de mildiu en Sinaloa, México, correspondieron con las descritas para *Peronospora ciceris*. Para el mejor de nuestro conocimiento, este es el primer estudio histopatológico que evidencia gran parte del proceso de colonización micelial y

End of English version

References / Referencias

- Adenle, V. O. & Cardwell, K. F. (2000). Seed transmission of maize downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) in Nigeria. *Plant pathology*, 49(5), 628-634. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00484.x
- Agarwal, D. K., Kulshreshtha, M., Bhalla, K., & Sarbhoj, A. K. (2003). *Peronospora ciceris*-a new species on *Cicer arietinum*. *Journal of Mycopathological Research*, 41(1), 71-73.
- Agarwal, P. C., Singh, B., Dev, U., Rani, I., Chand, D., & Khetarpal, R. K. (2006). Interception of *Peronospora manshurica* in soybean germplasm imported during 1976-2005. *Current Science*, 91(3), 347-358. Recuperado de: <http://www.iisc.ernet.in/currsci/aug102006/347.pdf>
- Carrillo-Fasio, J. A., Allende-Molar, R., & García-Estrada, R. (2012). *Métodos preventivos para el control de la rabia y mildiu del garbanzo*. Paper presented at the Memoria de capacitación, VIII Jornada del cultivo del garbanzo, Culiacán, Sinaloa, México.
- Chen, W., Sharma, H. C., & Muehlbauer, F. J. (2011). *Compendium of chickpea and lentil diseases and pests*. Minnesota, USA: American Phytopathological Society (APS Press).
- Ghosh, R., Sharma, M., Telangre, R., & Pande, S. (2013). Occurrence and distribution of chickpea diseases in central and southern parts of India. *American Journal of Plant Sciences* 4, 940-944. doi:10.4236/ajps.2013.44116
- Knights, E. J., Açıkoğuz, N., Warkentin, T., Bejiga, G., Yadav, S. S., & Sandhu, J. S. (2007). Area, production and distribution. In S. S. Yadav, R. J. Redden, W. Chen & B. Sharma (Eds.), *Chickpea breeding and management* (pp. 167-178). Trowbridge, UK: CAB International. Cromwell Press.
- Leyva-Mir, S. G., Cárdenas-Soriano, E., Tovar-Pedraza, J. M., Huerta-Espino, J., & Villaseñor-Mir, H. E. (2012). Estimación histopatológica del grado de infección inducido por *Stagonospora nodorum* (Berk.) en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Agronomía*, 20(1), 7-16.
- Mauch-Mani, B. (2002). Host resistance to downy mildew diseases. In P. T. N. Spencer-Phillips, U. Gisi & A. Lebeda (Eds.), *Advances in downy mildew research* (pp. 59-83). New York, USA: Springer. doi: 10.1007/0-306-47914-1_2
- Milholland, R. D., Papadopoulou, J., & Daykin, M. (1981). Histopathology of *Peronospora tabacina* in systemically infected burley tobacco. *Phytopathology*, 71, 73-76. doi: 10.1094/Phyto-71-73
- Nene, Y. L. (1980). Diseases of chickpea. In J. M. Green, Y. L. Nene & J. B. Smithson (Eds.), *Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement* (pp. 171-178). India: Hyderabad, A. P., Tropics.
- Nene, Y. L., Reddy, M. V., Haware, M. P., Ghanekar, A. M., Amin, K. S., Pande, S., & Sharma, M. (2012). Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. *Information Bulletin No. 28* (pp. 60). Patancheru, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- alteraciones histológicas inducidas por *P. ciceris*, en epidermis, mesófilo, floema y xilema de folíolos, así como en células embrionarias de semillas de garbanzo. Estos datos histológicos pueden ser usados como un componente dentro de futuros estudios, enfocados a evaluar diversas estrategias de manejo de la enfermedad.

Fin de la versión en español

- Reuveni, M. & Cohen, Y. (1978). Growth retardation and changes in phenolic compounds, with special reference to scopoletin, in mildewed and ethylene-treated tobacco plants. *Physiological Plant Pathology*, 12(2), 179-189. doi: 10.1016/0048-4059(78)90060-7
- Roongruangsree, U.-T., Olson, L. W., & Lange, L. (1988). The seed-borne inoculum of *Peronospora manshurica*, causal agent of soybean downy mildew. *Journal of Phytopathology*, 123(3), 233-243. doi: 10.1111/j.1439-0434.1988.tb04473.x
- Salinas-Pérez, R., Cortez-Moncada, E., & Macías-Cervantes, J. (2008). Guía para producir garbanzo en el norte de Sinaloa. *Folleto técnico no. 29* (pp. 44). Los Mochis, Sinaloa: INIFAP-CIRNO. Campo experimental Valle del Fuerte
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2013). Cierre de la producción agrícola por estado. Consultado el 10 de diciembre de 2013 en www.siap.gob.mx
- Shetty, H. S., Mathur, S. B., & Neergaard, P. (1980). Sclerospora graminicola in pearl millet seeds and its transmission. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(1), 127-134. doi: 10.1016/S0007-1536(80)80018-0
- Singh, D., & Mathur, S. B. (2004). *Histopathology of seed-borne infections*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Smith, P. A. & Price, T. V. (1997). Preliminary study of seed transmission of downy mildew in some vegetable brassica cultivars in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 26(1), 54-59. doi: 10.1071/AP97008
- Sugha, S. K., Develash, R. K., Singh, B. M., Thakur, B. R., & Tyagi, P. D. (1996). Nature of perennating structures of *Peronospora destructor*. *Indian Phytopathology*, 49(3), 260-264.
- Valenzuela-Herrera, V., Salinas-Pérez, R. A., Ramírez-Soto, M., Ortega-Murrieta, P. F., Fierros-Leyva, G., & González-González, D. (2012). *Líneas avanzadas de garbanzo blanco, de hábito erecto, resistentes a rabia y con adaptación a las regiones productoras de garbanzo en Sinaloa*. Paper presented at the Memoria de capacitación, VIII Jornada del cultivo del garbanzo, Culiacán, Sinaloa, México
- Van der Gaag, D. J., Frinking, H. D., & Geerds, C. F. (1993). Production of oospores by *Peronospora viciae* f. sp. *faba*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99(3), 83-91. doi: 10.1007/BF03041398

Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (Vol. Tercera edición): Cambridge University Press.

Wehtje, G. & Zimmer, D. E. (1978). Downy mildew of sunflower: biology of systemic infection and the

nature of resistance. *Phytopathology*, 68, 1568-1571.
Recuperado de: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n11_1568.PDF.