

ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 33, NÚMERO 2, 2015



Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA
SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A. C.

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados

Editor Técnico * Technical Editor

Lic. Ma. Yunuén López Muratalla

Composición Web * Web Composition

Ing. Eduardo Guzmán Hernández

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Dra. Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP

Dr. Ángel Rebollar Alviter, Universidad Autónoma Chapingo

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dra. Lilian Amorim, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Rodrigo Valverde, Louisiana State University, USA

Dr. Sami Jorge Michereff, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Dr. Pedro W. Crous, Pretoia & Free State (SA) Universities, Holland.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Colegio de Postgraduados

Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP

Dra. Graciela Ávila Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua

Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, Colegio de Postgraduados

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Dr. Cristian Nava Díaz, Colegio de Postgraduados

Dr. Remigio A. Guzmán Plazola, Colegio de Postgraduados

Dr. Jesús Pérez Moreno, Colegio de Postgraduados

Dr. Luis Pérez Moreno, Universidad de Guanajuato

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, Universidad Autónoma del Estado de México

Portada: Pericarp external symptom in Litchi fruit (*Litchi chinensis* C.).

Original: Misael Martínez Bolaños.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Actinomicetos aislados del compost y su Actividad Antagonista a Fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes) * Antagonistic Activity of Actinomycetes Isolated from Compost against Potato Pathogens (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes).**
Pérez-Rojas F, León-Quispe J y Galindo-Cabello N. 116
- Anthraxnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Litchi Fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, Mexico. * Anthracnosis (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi Chinensis* Soon.) en Oaxaca, México.**
Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E y Sánchez-López V. 140
- Efecto del acibenzolar S-metil en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum*) infectadas con *Phytophthora capsici* en diferentes edades * Effect of acibenzolar S-methyl on serrano pepper plants (*Capsicum annuum*) infected with *Phytophthora capsici* at different ages.**
Cosme-Velázquez Y, Guzmán-Plazola RA, Sandoval-Islas S, Corona-Torres T y Mendoza-Pérez D. 156
- Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Guerrero, México * Distribution and Frequency of Organisms Associated to Disease “Black Leg” of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Guerrero, Mexico.**
Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Sandoval-Islas JS, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L y Alejo-Jaimes A. 173
- Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México * Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico.**
Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 195
- NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATOLOGICAL NOTES**
- Epidemiología de la mancha vellosa (*Mycosphaerella caryigena*) y su impacto en la defoliación del nogal pecanero * Epidemics caused by *Mycosphaerella caryigena* and its impact on the defoliation of the pecan tree.**
Samaniego-Gaxiola JA, Aguilar-Pérez H y Pedroza-Sandoval A. 211
- Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena * Search for sources of resistance to *Poinsettia mosaic virus* in wild poinsettia plants.**
Jacobó-Villegas O, Valdovinos-Ponce G, Ramírez-Rojas S y Hernández-Juárez C. 219
- Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México * Socioeconomic and parasitological factors that limit cocoa production in Chiapas, Mexico.**
Hernández-Gómez E, Hernández-Morales J, Avendaño-Arrazate CH, López-Guillen G, Garrido-Ramírez ER, Romero-Nápoles J y Nava-Díaz C. 232

Comportamiento Espacial de la Roya Transversal del Gladiolo en Jiquipilco, Estado de México, México * Spatial behavior of gladiolus rust in Jiquipilco, State of Mexico, Mexico. 247
Quiñones-Valdez R, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildozola A y Cristóbal de la Cruz M.

Sensibilidad de especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas * In vitro sensitivity of two species of *Sclerotinia* spp. and *Sclerotium cepivorum* to biological control agents and fungicides. 256
Pérez-Moreno L, Belmonte-Vargas JR, Núñez-Palenius HG, Mendoza-Celedón B y Guzmán-Mendoza R.

Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes)

Actinoycetes isolated from compost and antagonistic activity against potato phytopathogens (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes)

Fernanda Pérez Rojas, Jorge León Quispe* y Nadia Galindo Cabello. Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n, Ciudad Universitaria, Lima – Perú. * Correspondencia: jorgeleonq@yahoo.com

Recibido: Noviembre 05, 2014. Aceptado: Junio 11, 2015.

Pérez-Rojas F, León-Quispe J y Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos Aislados del Compost y su Actividad Antagonista a Fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). Revista Mexicana de Fitopatología 33: 116-139.

Resumen. Una de las formas de control de fitopatógenos es a través del uso de microorganismos antagonistas. El compost, un producto orgánico es fuente de microorganismos capaces de producir metabolitos secundarios de interés agrícola. Se aislaron y evaluaron mediante cultivos *in vitro* la capacidad antagonista de 85 actinomicetos frente a fitopatógenos que afectan a *Solanum tuberosum*. De los aislados, 23.5% tuvieron actividad antagonista a *Ralstonia solanacearum*, 16.4% a *Pectobacterium carotovorum*, 43.5% a *Phytophthora infestans*, 25.8% a *Fusarium* sp y 61.1% a *Rhizoctonia solani*. Extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo y diclorometano de las cepas seleccionadas (AACI-5, ACZI-22, ACZII-35, ACZIII-84 y ACZIII-88) mostraron actividad antimicrobiana,

Abstract. One way of controlling phytopathogens is through the use antagonistic microorganisms. Compost is a source of microorganisms capable of producing secondary metabolites of agricultural interest. We isolated 85 actinomycetes *in vitro* cultures and evaluated their antagonist capacity against phytopathogens affecting *Solanum tuberosum*. Of the isolates, 23.5 % showed antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum*, 16.4 % against *Pectobacterium carotovorum*, 43.5 % against *Phytophthora infestans*, 25.8 % against *Fusarium* sp., and 61.1% against *Rhizoctonia solani*. Organic extracts obtained from the selected strains (AACI-5, ACZI-22, ACZII-35, ACZIII-84 y ACZIII-88) with ethyl acetate and dichloromethane showed antimicrobial activity. The most important was the ethyl acetate extract from the AACI-5 strain, which had a broader spectrum of activity and showed a minimum inhibitory concentration (MIC) against *Phytophthora infestans* of 0.0625 mg.mL⁻¹. The most active strains were identified as members of the genus *Streptomyces*. Due to the antagonist

siendo el de mayor importancia el extracto de acetato de etilo de la cepa AACI-5 por tener mayor espectro de actividad y presentar una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.0625 mg.mL⁻¹ frente a *Phytophthora infestans*. Las cepas con mayor actividad se identificaron como miembros del género *Streptomyces*. Los actinomicetos por su capacidad antagonista mostrada en el presente trabajo podrían ser considerados potenciales candidatos en el control de patógenos de este tubérculo en el marco de una agricultura sostenible.

Palabras clave: *Streptomyces*, compuestos bioactivos, microorganismos de suelos, patógenos de la papa, antagonismo.

El control biológico o biocontrol utilizando microorganismos se ha convertido en una alternativa en el tratamiento de patógenos de plantas, siendo considerado como una de las prácticas más eficientes y ecológicamente sanas en el desarrollo de una agricultura sostenible (Franco-Correa, 2009). Los fitopatógenos originan grandes pérdidas económicas en la agricultura, al disminuir tanto la cantidad, como la calidad de los productos cosechados, y por lo tanto su valor comercial. El control de estos patógenos por lo general se ha realizado empleando plaguicidas y otros químicos, los cuales han tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas (Serrano y Galindo, 2007). La aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica actualmente dificultades como el resurgimiento de plagas, el desarrollo de resistencia genética de microorganismos, la contaminación del ambiente y daños a la salud humana (Pérez, 2004).

El interés en el biocontrol de patógenos de plantas se ha incrementado actualmente, particularmente como una respuesta a la preocupación de los consumidores frente al uso de los agroquími-

capacity showed by actinomycetes in this work, they could be considered as potential candidates for controlling potato pathogens under the framework of sustainable agriculture.

Key words: *Streptomyces*, bioactive compounds, soil microorganisms, potato pathogens, antagonism.

Biological control (or biocontrol) through the use of microorganisms has become an alternative for the treatment of plant pathogens; it is considered one of the most efficient and ecologically sound practices for a sustainable agriculture (Franco-Correa, 2009). Phytopathogens cause great economic losses in agriculture, reducing both the quantity and the quality of harvested products, and thus their commercial value. The control of these pathogens has usually been done with pesticides and other chemicals, which has had negative effects on the environment and the quality of life of human populations (Serrano and Galindo, 2007). The systematic application of chemicals in agriculture currently faces difficulties such as the resurgence of pests, the development of genetic resistance in microorganisms, environmental pollution and damage to human health (Pérez, 2004).

The interest in biocontrol of plant pathogens has increased recently, particularly as a response to consumer concerns over the use of agrochemicals. Currently, biocontrol is already considered as one of the standard management practices of plant diseases caused mainly by pathogens of the genera *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* (Serrano and Galindo, 2007). In the control of these pathogens, it is important to select potential antagonists that can be used as biological controls, for which it is necessary, initially, to perform *in vitro* assays that provide information about their antagonist capacity in order to use them later in the field (Gohel *et al.*, 2006).

cos. Actualmente, el biocontrol ya es considerado como una de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas principalmente por patógenos de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* (Serrano y Galindo, 2007). En el control de dichos patógenos, resulta importante la selección de potenciales antagonistas que pueden ser utilizados como controladores biológicos, para lo cual es necesario realizar inicialmente ensayos *in vitro* que generen una orientación respecto a su capacidad antagonista y permitan potencialmente ser formulados y utilizados posteriormente en campo (Gohel *et al.*, 2006).

Entre los microorganismos útiles en el biocontrol de fitopatógenos se encuentran bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Bacillus* (Whipps, 2001). Estos microorganismos se encuentran en suelos fértiles, siendo el grupo más prolífico los actinomicetos, bacterias Gram positivas, aerobias y principales degradadores de la materia orgánica en el suelo con capacidades de producir compuestos antimicrobianos, terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Ezziyani *et al.*, 2004). Representan entre 20 a 60 % de la población microbiana del suelo fértil, siendo sus principales actividades las de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, promover el crecimiento de las plantas y producir una serie de metabolitos secundarios como vitaminas, enzimas y otros compuestos benéficos para las plantas (Bobadilla y Rincón, 2008). Adicionalmente, los actinomicetos ayudan a mejorar la fertilidad del suelo y a la vez producen compuestos bioactivos que permiten ejercer acción directa o indirecta como organismos de biocontrol de eventuales patógenos (Franco-Correa, 2008).

Los actinomicetos se caracterizan por producir metabolitos con actividad antimicrobiana, incluyendo biocontrol de fitopatógenos (Crawford *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2002). Cepas de *Streptomyces* sp. han mostrado capacidad de suprimir el crecimiento

Among the microorganisms useful for biocontrol of phytopathogenic bacteria are *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* and *Bacillus* (Whipps, 2001). These microorganisms are found in fertile soils; the most prolific group are the actinomycetes, aerobic Gram positive bacteria that are the main degraders of organic matter in the soil, with a capacity to produce antimicrobial compounds, terpenoids, pigments and extracellular enzymes (Ezziyani *et al.*, 2004). They represent about 20-60 % of the microbial population of fertile soil; their main activities are to fix nitrogen, solubilize phosphates, promote plant growth and produce a series of secondary metabolites such as vitamins, enzymes and other beneficial compounds for plants (Bobadilla and Rincon, 2008). In addition, actinomycetes help improve soil fertility and produce bioactive compounds that allow them to serve directly or indirectly as biocontrol organisms of potential pathogens (Franco-Correa, 2008).

Actinomycetes are characterized by producing enzymes with antimicrobial activity, including the biocontrol of phytopathogens (Crawford *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2002). Strains of *Streptomyces* sp. have shown an ability to suppress *in vitro* growth of pathogens, and, therefore, many of their metabolites have been proposed to inhibit the growth of these pathogens *in vivo* (Franco-Correa, 2009). Extracellular enzymes such as chitinases and β -1,3- glucanases play a significant role in antifungal and biocontrol activity, and are responsible for the mycoparasitism of certain strains of *Streptomyces* and the suppression of plant diseases (Goodfellow and Williams, 1983; Gonzales *et al.*, 2003).

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important crop worldwide, with an annual output of 328,865,936 MT (FAO, 2008). The potato crop of Peru is the most important in the

de fitopatógenos *in vitro*, y por ello, muchos de sus metabolitos han sido propuestos para inhibir el crecimiento de estos patógenos *in vivo* (Franco-Correa, 2009). Enzimas extracelulares como quitinasas y β -1,3-glucanasas desempeñan una función significativa en la actividad antifúngica y biocontroladora, siendo responsables del micoparasitismo ejercido por ciertas cepas de *Streptomyces* y la supresión de enfermedades de las plantas (Goodfellow y Williams, 1983; González *et al.*, 2003).

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es el cuarto cultivo más importante en el ámbito mundial, con una producción anual de 328, 865, 936 TM (FAO, 2008). En Perú, el cultivo de papa es el más importante en la zona andina, siendo la superficie cultivada de 249,000 ha. La producción de la papa en Perú se incrementó de 3,8 millones de TM en 2004 a 4,5 millones de TM en 2013, lo cual significó un crecimiento de 45% y una tasa promedio anual de 3,8% (INEI, 2014). Sin embargo, el cultivo de este tubérculo es afectado por varias enfermedades, siendo importantes las causadas por hongos y bacterias (Farfán y Gutiérrez, 2009). El “tizón tardío”, causada por el Chromista *Phytophthora infestans* ha sido considerado como el principal patógeno a escala mundial (Agrios, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la rizoctoniasis o costra negra (por la formación de esclerocios) y chancro del tallo (por las lesiones necróticas en los tallos) es un patógeno fúngico presente en todas las zonas productoras de papa del mundo (Torres, 2002). Son varias las especies de *Fusarium* que se citan como responsables de la “pudrición seca”. La bacteria *Ralstonia solanacearum* causante de “marchitez bacteriana” (Yabuuchi *et al.*; 1995) tiene gran impacto en el cultivo de la papa en climas fríos, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C (He *et al.*, 1983). Las bacterias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *caratovorum* (antes *Erwinia carotovorum*) y *P. chrysanthemi*,

Andean region, with a cultivated surface of 249,000 ha. Potato production in Peru increased from 3.8 million MT in 2004 to 4.5 million MT in 2013, an increase of 45 % and an average annual growth rate of 3.8 % (INEI, 2014). However, the cultivation of potatoes is affected by various diseases; among the most important are those caused by fungi and bacteria (Farfan and Gutierrez, 2009). The “late blight”, caused by Chromista *Phytophthora infestans*, has been regarded as the major pathogen worldwide (Agrios, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn, which causes rhizoctoniasis or black scurf (due to the formation of sclerotia) and stem blight (due to the necrotic lesions on the stems), is a fungal pathogen present in all potato producing areas of the world (Torres, 2002). Several species of *Fusarium* are cited as responsible for the “dry rot”. The bacterium *Ralstonia solanacearum*, which causes “bacterial wilt” (Yabuuchi *et al.*, 1995), has a great impact on potato crops in cold climates, although its optimum growth temperature is 28 °C (He *et al.*, 1983). The bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *caratovorum* (previously *Erwinia carotovora*) and *P. chrysanthemi*, cause the “soft rot” of potato tubers in both the field and in the store, as well as the “stem rot” or “blackleg” in growing plants (Elphinstone, 1987).

Compost is a highly humified organic fertilizer, rich in nutrients and a source of a variety of aerobic microorganisms, including actinomycetes, which develop in response to different levels of temperature, humidity, oxygen and pH (Arslan *et al.*, 2008). This research seeks to select strains of actinomycetes isolated from compost with potential inhibitory activity against pathogens affecting the potato crop (*Solanum tuberosum* L) and that could be subsequently used as biocontrol agents in the field.

causan la “pudrición blanda” de los tubérculos de la papa tanto en el campo como en el almacén, así como la “pudrición de los tallos” o “pierna negra” en plantas en crecimiento (Elphinstone, 1987).

El compost es un abono orgánico altamente humificado, rico en nutrientes y fuente de una variedad de microorganismos aerobios, entre ellos los actinomicetos, que se desarrollan en respuesta a diferentes niveles de temperatura, humedad, oxígeno y pH (Arslan *et al.*, 2008). Esta investigación busca seleccionar cepas de actinomicetos aislados del compost con potencial actividad inhibitoria de patógenos que afectan al cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L) con posterior aplicación potencial como agentes de biocontrol en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de compost. Fueron recolectadas 10 muestras de compost (100 g de muestra como promedio) de las instalaciones del predio conocido como “Casa Blanca” (propiedad particular) ubicado a 47 km de Lima – Perú. La toma de muestras se realizó en condiciones de esterilidad y posteriormente dichas muestras fueron colocadas en envases de primer uso y con tapa hermética. Fueron transportadas al laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su inmediato procesamiento.

Patógenos de *Solanum tuberosum*. Las cepas de patógenos fueron proporcionados por el Centro Internacional de la Papa (CIP), de Lima, Perú. Éstos incluyeron cultivos bacterianos de *Ralstonia solanacearum* (cepa 204 Biovar 2A aislada de *Solanum tuberosum* - Huambos – Cajamarca, Perú) y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (aislado de *Solanum tuberosum* - Chiras - Comas, Perú); así como los hongos *Rhizoctonia solani* (aislado de

MATERIALS AND METHODS

Compost samples. We collected 10 samples of compost (an average of 100 g of sample) from the facilities of the land property known as “Casa Blanca” located at 47 km from Lima, Peru. Sampling was conducted under sterile conditions; the samples were placed in single-use containers with a tight lid. The samples were then transported to the laboratory of Microbial Ecology at the Universidad Nacional Mayor de San Marcos for immediate processing.

Pathogens of *Solanum tuberosum*. The pathogenic strains were provided by the International Potato Center (CIP) in Lima, Peru. These included bacterial cultures of *Ralstonia solanacearum* (strain 204 Biovar 2A, isolated from *Solanum tuberosum*; Huambos, Cajamarca, Peru) and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (isolated from *Solanum tuberosum*; Chiras, Comas, Peru), as well as the fungi *Rhizoctonia solani* (isolated from *Solanum tuberosum*; Huancayo, Peru), *Fusarium* sp., (isolated from *Solanum tuberosum*; Huancayo, Peru) and Chromista *Phytophthora infestans* (isolated from *Solanum tuberosum* L. var canchan; Serrana, Oxapampa, Peru).

Isolation of Actinomycetes from compost. To isolate the actinomycetes, the compost samples were diluted one-tenth in saline 0.85 % (w/v) to 10⁻⁶, and 0.1 mL of each dilution was seeded by spreading it on Agar Czapek Dox, pH 7.2, and Agar starch Casein, pH 7.2 (Gurung *et al.*, 2009), adding in both cases nystatin (Merck) (50 µg.mL⁻¹) and cycloheximide (Merck) (50 µg.mL⁻¹). The cultures were incubated at 28 °C for 15 d. The actinomycetes colonies were collected and stored refrigerated in vials containing agar Czapek Dox plus glycerol (20 % v/v), according to Leon *et al.* (2007).

Solanum tuberosum Huancayo, Perú), *Fusarium* sp., (aislado de *Solanum tuberosum* Huancayo, Perú) y el Chromista *Phytophthora infestans* (aislado de *Solanum tuberosum* L. var. *canchan* Serrana – Oxapampa, Perú).

Aislamiento de actinomicetos a partir del compost. Para el aislamiento de actinomicetos, las muestras de compost fueron diluidas al décimo en solución salina 0.85 % (p/v) hasta 10^{-6} y se sembró 0.1 mL de cada dilución por diseminación en Agar Czapeck-Dox pH 7.2 y Agar Almidón Caseína pH 7.2 (Gurung *et al.*, 2009) suplementado en ambos casos con nistatina (Merck) ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cicloheximida (Merck) ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los cultivos fueron incubados a 28°C por 15 d. Se colectaron las colonias de actinomicetos y se conservaron en refrigeración en viales conteniendo agar Czapeck - Dox más glicerina (20% v/v) según León *et al.* (2007).

Selección de actinomicetos con actividad antagonista a bacterias fitopatógenas. Se realizó mediante el método modificado de “segunda capa” (Dopazo *et al.*, 1988). Los actinomicetos fueron sembrados como macrocolonias en Agar Czapeck Dox pH 7.2 e incubadas a 28 °C por 7 d. Las bacterias fitopatógenas fueron reactivadas en caldo nutritivo + 1% de glucosa (p/v), pH 7.0, y posteriormente inoculadas (10 μL) (0,5 escala Mac Farland) a 3 mL de agar semisólido licuado y temperado a 50°C y luego agregado rápidamente sobre los cultivos de los actinomicetos. Los cultivos fueron incubados a sus respectivas temperaturas de crecimiento (*R. solanacearum* a 30 °C por 48 h y *P. carotovorum* a 26°C por 48 h), realizándose luego las evaluaciones del tamaño (en mm) de los halos de inhibición (diámetro). Se consideró como positivo un diámetro \geq a 5 mm.

Selection of actinomycetes with antagonistic activity against plant pathogenic bacteria. This was performed by the modified “second layer method” (Dopazo *et al.*, 1988). The actinomycetes were seeded as macro-colonies on Agar Czapek Dox (pH 7.2) and incubated at 28 °C for 7 d. The phytopathogenic bacteria were reactivated in nutrient broth plus 1% glucose (w/v), pH 7.0, and then inoculated (10 μL) (0.5 McFarland scale) into 3 mL of liquefied semisolid agar, tempered at 50 °C and then added quickly on the actinomycetes cultures. The cultures were incubated at their respective growth temperatures (*R. solanacearum* at 30 °C for 48 h and *P. carotovorum* at 26 °C for 48 h); afterwards, we evaluated the size (in mm) of the inhibition zones (mm diameter). A diameter \geq 5 mm was considered positive.

Selection of actinomycetes with antagonistic activity against chromista and fungi. This test was performed by the coculture method indicated by Taechowisan *et al.* (2005). *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. were reactivated and seeded on potato dextrose agar (PDA; Merck), while the oomycete *Phytophthora infestans* was seeded on rye agar; all cases were incubated at 28 °C for 7 d. The actinomycetes were seeded on PDA at one end of the plates. The pathogen cultures were cut into small pieces (0.5 cm per side) and placed at the opposite end from each actinomycete culture. This was incubated at 28 °C for 4-5 d; we then proceeded to assess the extent of the growth distance (mm) between the actinomycete and the phytopathogen. A distance \geq 5 mm was considered positive.

Microscopic and macroscopic analysis of selected actinomycetes. This was done using microcultures of actinomycetes previously selected for their higher antagonistic activity. We used the

Selección de actinomicetos con actividad antagonista al cromista y hongos. Esta prueba se realizó mediante el método de co-cultivo señalado por Taechowisan *et al.*, (2005). *Rhizoctonia solani*, y *Fusarium* sp, fueron reactivados y sembrados en agar papa dextrosa (APD) (Merck); mientras el oomiceto *Phytophthora infestans* en agar centeno, incubándose en todos los casos a 28 °C por 7 d. Los actinomicetos se sembraron en APD en un extremo de las placas. Los cultivos de patógenos se cortaron en trozos pequeños (0,5 cm de lado) y se colocaron al extremo opuesto del cultivo de cada actinomiceto. Se incubó por 4-5 d a 28 °C; luego se procedió a efectuar la evaluación de la medida de la distancia de crecimiento (mm) entre el actinomiceto y el fitopatógeno. Se consideró como positiva una distancia \geq a 5 mm.

Análisis microscópico y macroscópico de actinomicetos seleccionados. Se realizó mediante microcultivos de actinomicetos previamente seleccionados por su mayor actividad antagonista. Se aplicó el método de “bloques de agar” según Holt *et al.*, (1994) con incubación en cámara húmeda a 28 °C por 5-7 d. La observación de las características morfológicas de su estructura micelial y de esporulación se realizó utilizando un microscopio compuesto (Nikon) con el objetivo de inmersión (100X) en láminas portaobjeto preparadas con Azul de Lactofenol (Merck). En la evaluación macroscópica se tuvo en cuenta características fenotípicas de las colonias, tales como color, forma, tamaño, elevación, textura y pigmento difusible de las mismas.

Obtención del extracto crudo del compuesto antimicrobiano. Se realizó según Pandey *et al.* (2004) modificada para actinomicetos de suelos. Actinomicetos seleccionados, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 150 mL del medio extracto de levadura más glucosa (Sultan *et al.*,

“method of agar blocks” according to Holt *et al.* (1994), with incubation in a moist chamber at 28 °C for 5-7 d. The morphological characteristics of the mycelial and sporulation structure were observed using a compound microscope (Nikon) with immersion objective (100X) on slides prepared with Lactophenol blue (Merck). For the macroscopic evaluation, we considered the phenotypic characteristics of the colonies, such as color, shape, size, elevation, texture and diffusible pigment.

Obtaining the crude extract of antimicrobial compound. This was done according to the method of Pandey *et al.* (2004) modified for soil actinomycetes. Selected actinomycetes were inoculated in 500 mL Erlenmeyer flasks with 150 mL of the yeast extract-glucose medium (Sultan *et al.*, 2002). The cultures were incubated at 28 °C for 10 d with constant stirring of 250 rpm, and then centrifuged at 4,000 rpm for 25 min. The recovery of antimicrobial metabolites from the supernatant was carried out by extraction with ethyl acetate and dichloromethane (Merck) (1:1, v/v), and vigorous stirring for 1 h (Liu *et al.*, 1986). The crude extract was concentrated and separated using a rotary evaporator (Buchi R-3000) at 40 °C; the residue was then weighed and reconstituted with dimethyl sulfoxide (DMSO; 10%) for storage and later analysis.

Determining the antimicrobial activity of the crude extract. Volumes of 50 μ L of crude extract recovered and reconstituted (4 mg/mL) were placed in wells (5mm) bored in Nutrient Agar medium plus 1 % glucose, where the control phytopathogenic bacteria had been previously seeded. The cultures were incubated at 30 °C for 48 h (*R. solanacearum*) and at 26 °C for 48 h (*P. carotovorum*). The medium used in the tests with phytopathogenic

2002). Los cultivos fueron incubados a 28 °C por 10 d en agitación constante de 250 rpm, y posteriormente centrifugados a 4000 rpm por 25 min. La recuperación de metabolitos antimicrobianos a partir del sobrenadante se realizó mediante extracción con acetato de etilo y diclorometano (Merck) en una proporción 1:1 (v/v) y agitado vigorosamente por 1 h (Liu *et al.*, 1986). El extracto crudo fue concentrado y separado con ayuda de un evaporador rotatorio (BUCHI R- 3000) a 40 °C; luego el residuo fue pesado y reconstituido con dimetilsulfoxido (DMSO) al 10 % para su conservación y análisis posterior.

Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto crudo. Volúmenes de 50 µL del extracto crudo recuperado y reconstituido (4 mg/mL), se colocó en pocillos (5 mm) practicados sobre el medio Agar Nutritivo + 1 % de glucosa, donde fue previamente sembrada la bacteria testigo fitopatógena. Los cultivos fueron incubados a 30 °C por 48 h (*R. solanacearum*) y a 26 °C por 48 h (*P. carotovorum*). En las pruebas frente a los hongos fitopatógenos el medio utilizado fue APD con incubación a 28 °C por 5 d. La actividad antimicrobiana en todos los casos se determinó por la medida del tamaño del halo de inhibición (mm de diámetro) según Pandey *et al.* (2004).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto crudo. Se realizó según Caviedes *et al.* (2002) en microplacas de 96 pocillos (Pure Grade – Merck). Las pruebas se realizaron distribuyendo las diluciones de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados en el caldo nutritivo + 1% de glucosa a doble concentración para las bacterias y caldo extracto de levadura + glucosa a doble concentración para los hongos y el oomiceto *P. infestans*. La cepa fitopatógena agregada a cada pocillo fue de 20 µL. Se incubó por 48 h para las bacterias

fungi was PDA, with incubation at 28° C for 5 d. In all cases, the antimicrobial activity was determined by measuring the size of the inhibition zone (mm in diameter) according to Pandey *et al.* (2004).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of crude extract. This was performed according to Caviedes *et al.* (2002) in 96-well microplates (Pure Grade-Merck). The tests were performed by spreading the dilutions of the crude extracts of the selected actinomycetes on the nutrient broth plus 1 % glucose, with double concentration of the bacteria and the yeast extract broth plus glucose, and double concentration also of the fungi and the oomycete *P. infestans*. The volume of the phytopathogenic strain added to each well was 20 µL. This was incubated for 48 h in the case of bacteria and for 5 d in the case of fungi and chromista. After this time, 50 µL of tetrazolium (Sigma) were added to all wells, which were then incubated for 24 h. A color change from yellow to purple was interpreted as bacterial growth.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Actinomycetes from compost. A total of 85 strains of actinomycetes were isolated from compost piles from the land property “Casa Blanca”. Of these isolates, 51 were recovered from Czapek Dox agar (CDA) and 34 from starch casein agar (SCA). The isolates stored for further study were labelled according to their growth in the primary isolation medium and the sample number. In this work, the primary isolate of actinomycetes from compost was slightly higher in CDA compared to SCA (Table 1). These results are similar to those obtained by Horna (1996), although it should be noted that in that case the isolation was made from marine sediment, a completely different substrate to the one used in the present work.

y 5 d para los hongos y el cromista. Al cabo de este tiempo, se agregó 50 µL de tetrazolium (Sigma) a todos los pocillos y se incubaron durante 24 h. Un cambio de color del amarillo al púrpura fue interpretado como crecimiento de bacterias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de actinomicetos del compost. Se aislaron un total de 85 cepas de actinomicetos provenientes de pilas de compost del predio “Casa Blanca”. De los aislados, 51 actinomicetos se recuperaron del agar Czapeck Dox (ACZ) y 34 del agar almidón caseína (AAC). Los aislados para estudios posteriores se codificaron de acuerdo a su crecimiento en el medio de aislamiento primario y el número de muestreo.

En el presente trabajo, el aislamiento primario de actinomicetos a partir del compost fue ligeramente mayor en ACZ en comparación al AAC (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Horna (1996), aunque cabe señalar que en este último caso el aislamiento se realizó a partir de sedimento marino, un sustrato totalmente diferente al del presente trabajo.

Actinomicetos antagonistas a fitopatógenos de papa. De la totalidad de actinomicetos aislados (n=85), 65 (76.4 %) mostraron tener actividad antagonista al menos frente a un fitopatógeno en prueba y 20 (23.5 %) resultaron negativos. Asimismo, 20 (23.5 %) resultaron tener actividad en contra de *Ralstonia solanacearum* y 14 (16.4 %) frente a *Pectobacterium carotovorum* (Figura 1). El aislamiento con mayor actividad contra *R. solanacearum* fue la cepa ACZII-35 (32 mm de diámetro), en cambio contra *P. carotovorum* mostró mayor actividad la cepa AACI-5 (30 mm) (Cuadro 2). Asimismo, los actinomicetos del compost evaluados por su

Actinomicetes antagonistic to potato pathogens.

Of all the isolated actinomyces (n=85), 65 (76.4 %) showed antagonistic activity against at least one plant pathogen in the tests, while 20 (23.5 %) did not show any. Likewise, 20 isolated actinomyces (23.5 %) showed activity against *Ralstonia solanacearum*, and 14 (16.4 %) against *Pectobacterium carotovorum* (Figure 1). The isolate with the highest activity against *R. solanacearum* was the ACZII-35 strain (32 mm in diameter), while against *P. carotovorum*, the highest activity was shown by the AACI-5 strain (30 mm) (Table 2). In addition, the evaluation of actinomyces from compost by their antagonism against fungi, indicated that 22 strains (25.8 %) have activity against *Fusarium* sp., 52 isolates (61.1 %) against *Rhizoctonia solani* and 36 strains (43.5 %) against *Phytophthora infestans* (Figure 1). Of the evaluated actinomyces, 4 strains (4.7 %) (ACZI-24, ACZII-34, ACZII-52, ACZIII-69) showed a broad spectrum of antagonistic activity against the 5 phytopathogens, 10 strains showed antagonistic activity against 3 fungal pathogens, and 12 strains against the 2 bacterial pathogens (Table 2 and 3; Figure 2). The percentage of actinomyces that inhibited at least one fungal pathogen was 72.9 %; in contrast, 43.5% inhibited chromista and 23.5 %

Cuadro 1. Actinomicetos aislados de pilas de compostaje en proceso final, en el predio “Casa Blanca”, ubicado en Lurín, Lima, Perú.

Table 1. Isolated actinomyces from piles of compost in the final process, in the property of “Casa Blanca”, located in Lurín, Lima, Peru.

Medio de cultivo	Muestras			Total (%)
	I	II	III	
Agar Czapeck (ACZ)	16	16	19	51 (60)
Agar Almidón Caseína (AAC)	12	13	9	34 (40)
Total	28	29	28	85 (100)

antagonismo frente a hongos indican que 22 cepas (25.8 %) tienen actividad contra *Fusarium* sp., 52 cepas (61.1 %) contra *Rhizoctonia solani* y 36 cepas (43.5 %) contra *Phytophthora infestans* (Figura 1). De los actinomicetos evaluados, 4 cepas (4.7 %) (ACZI-24, ACZII-34, ACZII-52, ACZIII-69) mostraron amplio espectro de actividad antagonista a los 5 fitopatógenos; 10 cepas a los 3 patógenos fúngicos y 12 cepas a las 2 bacterias patógenas (Cuadros 2 y 3; Figura 2). El 72.9 % de actinomicetos inhibieron por lo menos un patógeno fúngico, en contraste el 43.5 % lo hicieron al cromista y el 23.5 % inhibieron por lo menos una de las bacterias patógenas. Los aislamientos con mayor actividad de inhibición fueron ACZI-22 frente a *R. solani* (inhibición de 27 mm de distancia) (Figura 3); ACZII-84 y ACZIII-88 a *Fusarium* sp (18 mm de distancia) (Figura 4) y AACI-5 a *P. infestans* (22 mm de distancia) (Cuadro 3 y Figura 5). Prapagdee *et al.* (2008) aislaron 146 cepas de actinomicetos de rizosfera y los confrontaron con dos hongos fitopatógenos (*Colletotrichum gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii*), solo 10 aislamientos mostraron capa-

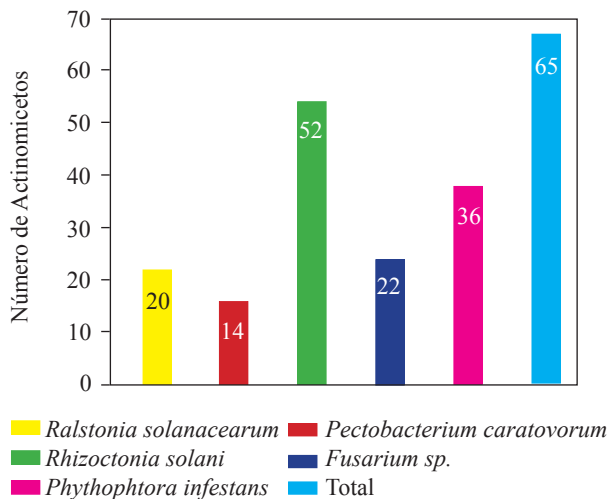


Figura 1. Actividad de antagonismo de actinomicetos del compost frente a 5 patógenos de papa.

Figure 1. Antagonistic activity of actinomycetes from compost against 5 potato pathogens.

Cuadro 2. Tamaño de los halos de inhibición originados por actinomicetos aislados de compost frente a bacterias patógenas de *Solanum tuberosum*.

Table 2. Size of the halos of inhibition caused by actinomycetes isolated from compost to combat pathogenic bacteria of *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Halos de inhibición (mm)	
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
ACZI-2	11	(-)
ACZI-8	17	14
ACZI-24	21	21
ACZII-2	9	(-)
ACZII-34	25	17
ACZII35	32	24
ACZII-42	17	(-)
ACZII-52	16	20
ACZIII-62	19	17
ACZIII-69	19	19
ACZIII-75	14	(-)
ACZIII-82	15	(-)
AACI-5	28	30
AACI-9	18	18
AACII-41	18	(-)
AACII-44	17	(-)
AACII-45	10	13
AACIII-60	20	22
AACIII-65	17	20
AACIII-71	18	19
AACIII-72	16	(-)

Actividad de inhibición: buena ≥ 25 mm; intermedia <25 y >15 mm; escasa ≤ 15 mm; no actividad (-) / Inhibitory activity : Good ≥ 25 mm ; Intermediate <25 and >15 mm ; ≤ 15 mm Scarce ; No activity (-).

inhibited at least one of the pathogenic bacteria. The isolates with the highest inhibitory activity were ACZI-22, against *R. solani* (inhibition of 27 mm in distance) (Figure 3), ACZII-84 and ACZIII-88 against *Fusarium* sp. (18 mm in distance) (Figure 4) and AACI-5 against *P. infestans* (22 mm in distance) (Table 3 and Figure 5). Prapagdee *et al.* (2008) isolated 146 strains of actinomycetes from rhizosphere soil and confronted them with two pathogenic fungi (*Colletotrichum gloeosporioides*

Cuadro 3. Cepas de actinomicetos del compost seleccionados por su mayor actividad antagonista a hongos fitopatógenos de *Solanum tuberosum* (zona de inhibición en mm).

Table 3. Actinomycete strains from compost selected for its greater antagonist activity to phytopathogenic fungi of *Solanum tuberosum* (Inhibition zone in mm).

Actinomicetos	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Phytophthora infestans</i>
ACZI-8	20	9	9
ACZI-10	18	(-)	16
ACZI-11	21	(-)	14
ACZI-13	18	(-)	12
ACZI-18	21	(-)	(-)
ACZI-21	24	(-)	14
ACZI-22	27	(-)	17
ACZII-34	17	12	15
ACZII-37	15	(-)	10
ACZII-38	14	11	14
ACZII-43	15	11	11
ACZII-47	21	(-)	(-)
ACZII-52	17	14	12
ACZII-53	18	(-)	11
ACZIII-66	16	(-)	14
ACZIII-67	17	(-)	13
ACZIII-69	15	15	7
ACZIII-75	14	13	17
ACZIII-84	25	18	12
ACZIII-88	25	18	22
AACI-5	(-)	11	21
AACI-6	17	(-)	(-)
AACI-9	15	12	12
AACI-14	23	(-)	(-)
AACI-15	19	(-)	(-)
AACI-19	20	(-)	(-)
AACI-20	24	(-)	11
AACII-36	19	(-)	10
AACII-39	17	(-)	16
AACII-41	16	10	12
AACII-44	20	15	(-)
AACII-48	17	(-)	17
AACII-49	19	(-)	14
AACIII-68	13	(-)	16
AACIII-71	(-)	16	(-)
AACIII-76	18	(-)	14

Actividad de inhibición: Buena ≥ 20 mm; intermedia ≤ 20 mm > 15 mm; escasa < 15 mm; no actividad (-) / Inhibition activity: Good ≥ 20 mm; intermediate ≤ 20 mm > 15 mm; meagre < 15 mm; no activity (-).

idad antagonista a ambos patógenos; de manera similar, en el presente trabajo solo 10 aislados mostraron tal capacidad frente a los tres hongos fitopatógenos evaluados. Los actinomicetos de suelos han resultado ser excelentes antagonistas a fitopa-

and *Sclerotium rolfsii*); only 10 isolates showed antagonistic capacity against both pathogens. Similarly, in the present work only 10 isolates showed such capacity against the three pathogenic fungi tested. Soil actinomycetes have proved

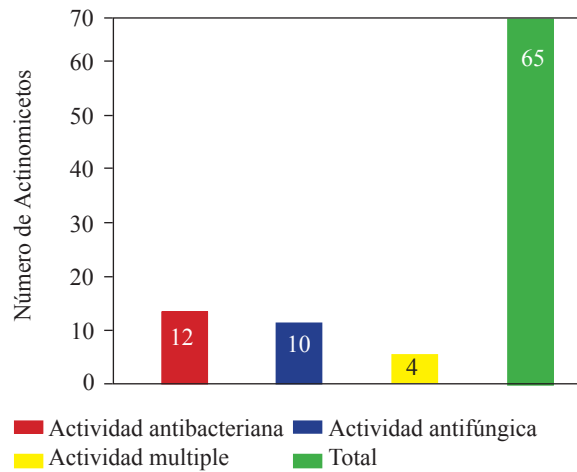


Figura 2. Actividad antagonista (múltiple, antibacteriana y antifúngica) de actinomicetos.

Figure 2. Antagonist activity (multiple, antibacterial and antifungal) of actinomycetes.

tógenos. Así, Ningthoujam *et al.* (2009) evaluaron 33 cepas de actinomicetos de suelos, de los cuales 4 mostraron actividad frente a patógenos de cultivos de arroz como *Curvularia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium oxysporum*.

excellent antagonists against plant pathogens. Thus, Ningthoujam *et al.* (2009) evaluated 33 strains of soil actinomycetes, of which 4 showed activity against rice pathogens such as *Curvularia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae* and *Fusarium oxysporum*. Furthermore, Iznagas *et al.* (2004) reported that of 563 actinomycetes isolated from Cuban soils, 286 showed antifungal activity against plant pathogens. In this study, 23.5 % of the isolates showed antagonistic activity against *R. solanacearum*, a slightly lower percentage than that obtained by Bittencourt & Da Silva (1999), who evaluated 190 actinomycetes isolated from the soil and rhizoplane of a tomato crop, and found that 52 of them showed active against *R. solanacearum*. Toledo (2004) evaluated three strains of *Bacillus* sp. obtained from soils that showed biocontrol activity *in vitro* against the pathogen *P. carotovorum*. Likewise, Reinozo *et al.* (2006) isolated *Bacillus* sp. from soil and found 7 strains with inhibitory effect *in vitro* against *P. carotovorum*. Although bacteria of the genus *Bacillus* are generally use for

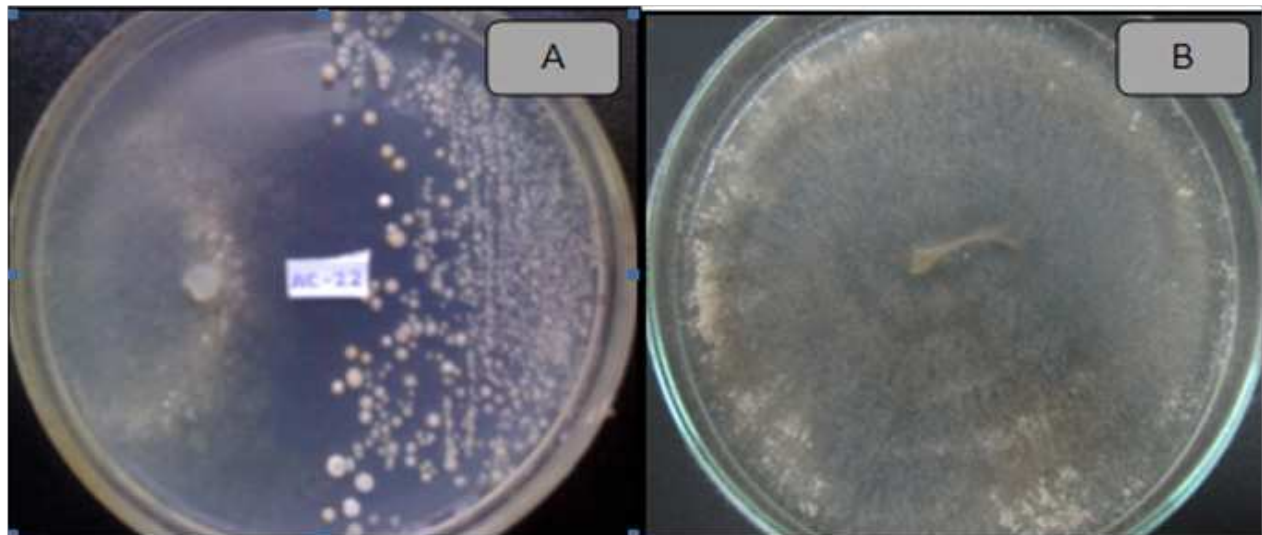


Figura 3. Actividad antifúngica del actinomiceto ACZI-22 frente a *Rhizoctonia solani* (A), control (B).

Figure 3. Antifungal activity of actinomycete ACZI-22 against *Rhizoctonia solani* (A), control (B).

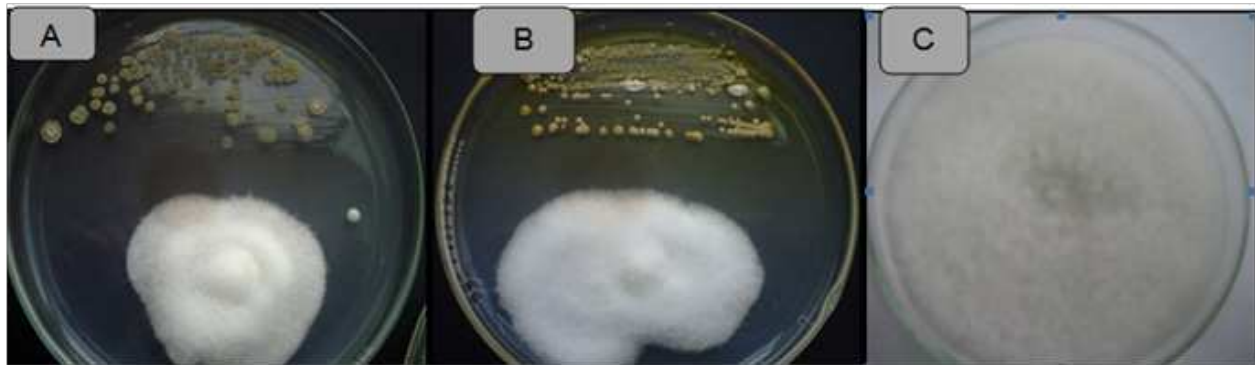


Figura 4. Actividad antagonista de actinomicetos frente a *Fusarium* sp. Cepa ACZIII-84 (A), cepa ACZIII-88 (B), control (C).
Figure 4. Antagonistic activity of Actinomycetes against *Fusarium* sp. Strain ACZIII-84 (A), strain ACZIII-88 (B), control (C).



Figura 5. Actividad antagonista de actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*. Cepa ACZIII-88 (A), cepa AACI-5 (B), control (C).
Figure 5. Antagonistic activity of Actinomycetes against *Phytophthora infestans*. Strain ACZIII-88 (A), strain AACI-5 (B), control (C).

Por otro lado, Iznaga *et al.*, (2004) reportaron que de 563 actinomicetos aislados de suelos cubanos, 286 mostraron actividad antifúngica a patógenas de plantas. En el presente trabajo, el 23.5 % de los aislados tuvieron actividad antagonista frente a *R. solanacearum*, porcentaje ligeramente menor a los resultados obtenidos por Bittencourt & Da Silva (1999), quienes evaluaron 190 actinomicetos aislados de suelo y rizoplano del cultivo de tomate frente a *R. solanacearum*, resultando 52 de ellos activos contra este patógeno. Toledo (2004), evaluó tres cepas de *Bacillus* sp, obtenidas de suelos, las cuales presentaron capacidad biocontroladora *in vitro*

the biocontrol of crop diseases, it is also important to note that actinomycetes play an important role in soil colonization. Oskay *et al.* (2004) tested 50 soil actinomycetes against plant pathogens and found 3 strains that were active against *Pectobacterium amylovora*, 5 against *Pseudomonas viridiflava*, 4 against *Agrobacterium tumefaciens*, and 5 against *Clavibacter michiganensis*. In this study, 13 actinomycetes were antagonistic against *P. carotovorum*, indicating that strains isolated from compost had a higher inhibitory capacity. These strains showed antibacterial and antifungal capacity.

sobre el patógeno *P. carotovorum*. Así mismo, Reinozo *et al.* (2006) aislaron *Bacillus* sp. del suelo, y 7 cepas tuvieron efecto inhibitorio *in vitro* sobre *P. carotovorum*; si bien las bacterias del género *Bacillus* son generalmente usadas para el biocontrol de enfermedades de cultivos, también es importante resaltar que los actinomicetos juegan un papel muy importante en la colonización de los suelos. Oskay *et al.* (2004) evaluaron 50 actinomicetos de suelos frente a fitopatógenos, de los cuales 3 tuvieron actividad contra *Pectobacterium amylovora*, 5 contra *Pseudomonas viridiflova*, 4 contra *Agrobacterium tumefaciens* y 5 contra *Clavibacter michiganensis*. En el presente trabajo, 13 actinomicetos fueron antagonistas contra *P. carotovorum*, mostrando que las cepas aisladas del compost resultan tener mayor capacidad de inhibición. Estas cepas mostraron capacidad antibacteriana y antifúngica.

Respecto a *Fusarium* sp., el presente estudio revela que el 25.8 % de los aislados resultaron antagonistas a este hongo, porcentaje considerablemente mayor comparado con los estudios de Oskay (2009), quien evaluó la actividad antifúngica de *Streptomyces* aislados de suelos frente a fitopatógenos como *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, siendo éste último ser menos sensible a la actividad antagonista del *Streptomyces*. De Boer *et al.* (1998) demostraron que 12 % de las bacterias quitinolíticas generaron inhibición frente a *F. oxysporum*, mientras que 56 % inhibió a *F. culmorum*. Por otro lado, Ikeda *et al.* (2000) evaluaron 4000 actinomicetos, de los cuales solo 27 % resultaron ser antagonistas contra *Fusarium* sp. De estas investigaciones se puede concluir que *Fusarium* sp. tiene una gran variación en términos de susceptibilidad frente a los compuestos activos de actinomicetos.

El antagonismo de actinomicetos a *R. solani* en este estudio estuvo representado por 61.2 % de los aislados. Kathiresan *et al.* (2005) evaluaron

Regarding *Fusarium* sp., this study revealed that 25.8 % of the isolates were antagonistic to the fungus, a considerably higher percentage compared to the studies by Oskay (2009), who evaluated the antifungal activity of *Streptomyces* isolated from soil against plant pathogens such as *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*; the latter was the least sensitive to the antagonistic activity of *Streptomyces*. De Boer *et al.* (1998) demonstrated that 12% of chitinolytic bacteria had inhibitory effects against *F. oxysporum*, while 56% inhibited *F. culmorum*. In addition, Ikeda *et al.* (2000) evaluated 4000 actinomycetes, of which only 27% were found to be antagonists against *Fusarium* sp. From these studies, it can be concluded that the susceptibility of *Fusarium* sp. to the active compounds of actinomycetes varies greatly.

In this study, 61.2 % of the isolates of actinomycetes showed antagonism against *R. solani*. Kathiresan *et al.* (2005) evaluated actinomycetes, though isolated from marine sediment, against different plant pathogens, reporting that 31% were effective against *R. solani*. That result is lower than the one found in this study; even though marine actinomycetes are considered greater producers of these metabolites. Meanwhile, Farfan and Gutierrez (2009) evaluated the antagonistic effect of 13 compost actinomycetes against *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp.; 3 of these isolates were found to have the highest percentages of inhibition against *Rhizoctonia* sp., and 5 against *Fusarium* sp.

Regarding the size of the inhibition zones, in the present study, actinomycetes inhibited up to 27 mm in distance against *R. solani*. Rothrock and Gottlieb (1981) reported inhibition zones of up to 15 mm, which indicates that our strains had higher antagonistic activity against this plant pathogen. Furthermore, *P. infestans* was inhibited by 43.5% of the actinomycete strains evaluated in this study;

actinomicetos, aunque aislados de sedimento marino contra diferentes fitopatógenos, reportando entre otros que 31 % tuvieron efectividad contra *R. solani*. Este resultado es menor al registrado en este estudio, a pesar que los actinomicetos marinos son considerados como mayores productores de estos metabolitos. Por su parte, Farfán y Gutiérrez (2009) evaluaron el efecto antagonista de 13 actinomicetos del compost sobre *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.; 3 de estos aislados resultaron tener los mayores porcentajes de inhibición de *Rhizoctonia* sp. y 5 de *Fusarium* sp.

Respecto al tamaño de las zonas de inhibición, en el presente estudio los actinomicetos llegaron a inhibir hasta 27 mm de distancia frente a *R. solani*. Rothrock y Gottlieb (1981) reportaron zonas de inhibición de hasta 15 mm, lo que nos indica que nuestras cepas presentan mayor capacidad de antagonismo a este fitopatógeno. Por otro lado, *P. infestans* fue inhibida por 43.5 % de las cepas de actinomicetos evaluadas en este estudio; este valor es menor comparado a los resultados de Valois *et al.* (1996) quienes reportaron que *Phytophthora* sp. fue inhibida por 72 % de los actinomicetos aislados de suelos.

En las pruebas de antagonismo en el presente estudio se utilizó con éxito el agar Czapeck (ACZ); sin embargo, Al-Zahrani (2007) quien evaluó la actividad antagonista de *Streptomyces* sp. frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* y hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* reportó mejores resultados en los medios agar almidón caseína para bacterias y agar extracto de malta-levadura, agar Sabouraud dextrosa y agar avena para los hongos. Las pruebas de antagonismo frente a los hongos patógenos efectuadas en el presente estudio se realizaron en el medio APD, demostrando que este medio es adecuado para las evaluaciones efectuadas. Otros autores

this value is lower compared to the results of Valois *et al.* (1996), who reported that *Phytophthora* sp. was inhibited by 72 % of the actinomycetes isolated from soils.

In the present study, Czapek agar (CZA) was used successfully in antagonism tests; however, Al-Zahrani (2007), who evaluated the antagonistic activity of *Streptomyces* sp. against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* and fungal phytopathogens such as *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*, reported better results in media starch casein agar media against bacteria, and in yeast-malt extract agar, Sabouraud dextrose agar and oatmeal agar against fungi. The antagonism tests against pathogenic fungi made in the current study were performed on PDA medium, which demonstrated its suitability for such tests. Other authors also used PDA in similar tests, even suggesting that it enhanced pathogen inhibition (Ezziyyani *et al.*, 2004; Farfan and Gutiérrez, 2009). Oatmeal agar (recommended for growing *Phytophthora infestans*) was also used successfully in this work, unlike the findings of Duke and Quintana (2008) in similar tests of actinomycetes against *F. oxysporum*. These results indicate that the mode of action of the antagonists may vary according to the control pathogen. The antagonism varies not only between fungi of different genera, as is the case in this study, but also between fungi of the same genus but different species; one example is the case of De Boer *et al.* (1998), who reported that 12 % of chitinolytic bacteria inhibited the growth of *F. oxysporum*, while 56 % inhibited the growth of *F. culmorum*.

Macroscopic and microscopic analysis of selected strains. For the macroscopic and microscopic evaluation, we considered only the actinomycetes the showed the highest antagonism

en pruebas similares también utilizaron APD, sugiriendo inclusive su uso porque consideran que intensifica la inhibición del patógeno (Ezziyyani *et al.* 2004; Farfán y Gutiérrez, 2009). El agar avena (recomendado para el crecimiento de *Phytophthora infestans*) también se utilizó con éxito en el presente trabajo, a diferencia de lo encontrado por Duque y Quintana (2008) en pruebas similares de actinomicetos frente a *F. oxysporum* no tuvieron los mismos resultados. Estos resultados nos indican que el modo de acción de los antagonistas puede variar según el patógeno testigo. El antagonismo no solo varía entre hongos de diferente género como es el caso de este estudio, sino también entre hongos del mismo género pero diferentes especies; por mencionar el caso de De Boer *et al.* (1998) quienes reportaron que 12 % de las bacterias quitinolíticas antagonistas inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*, mientras que 56 % inhibió el crecimiento de *F. culmorum*.

Análisis macroscópico y microscópico de cepas seleccionadas. En la evaluación macroscópica y microscópica se tuvo en cuenta sólo a los actinomicetos que mostraron mayor antagonismo tanto a las bacterias como a los hongos fitopatógenos. Los actinomicetos seleccionados fueron las cepas ACZII-35 y AACI-5 (por ser mejores antagonistas a *R. solanacearum* y *P. carotovorum*, respectivamente) y las cepas ACZI-22, ACZIII-88 y ACZIII-84 (por ser mejores antagonistas contra *R. solani*, *Fusarium* sp. y *P. infestans* respectivamente). Los resultados se pueden observar en la Cuadro 4. Las características de cultivo y las observaciones microscópicas a partir de microcultivos y el comportamiento cultural de las 5 cepas de actinomicetos seleccionados nos indican que todos son posibles miembros del género *Streptomyces* (Figura 6), sin embargo se debe confirmar mediante pruebas moleculares.

against both phytopathogenic bacteria and fungi. The selected actinomycetes were the strains ACZII-35 and AACI-5 (better antagonists against *R. solanacearum* and *P. carotovorum*, respectively), and strains ACZI-22, ACZIII-88 and ACZIII-84 (better antagonists against *R. solani*, *Fusarium* sp. and *P. infestans*, respectively). The results are shown in Table 4. The culture characteristics, the microscopic observations in microcultures and the culture behavior of the 5 selected strains of actinomycetes, indicated that all were potential members of the genus *Streptomyces* (Figure 6), but this must be confirmed by molecular testing.

According to the literature, the genus *Streptomyces* is the main responsible for the production of most bioactive metabolites. In particular, *Streptomyces* is part of an important group within the actinomycetes, as these are able to produce various types of secondary metabolites (Baltz, 2006).

But soil, including compost, is not only inhabited by *Streptomyces*; there are also other kinds of actinomycetes, as reported by Remya and Vijayakumar (2008), who in 64 colonies of actinomycetes, identified *Streptomyces* (30) (47 %), *Galactomyces* (10), *Nocardiosis* (7), *Nocardioides* (4), *Actinopolyspora* (3), *Nocardia* (3), *Kibdelosporangium* (2), *Actinosynnema* (1), *Kineosporia* (1) and *Saccharopolyspora* (1). Similarly, Nakashima *et al.* (2009) isolated 800 strains of actinomycetes, and compared them with strains from the NBRC (National Biological Research Center); 64 of them showed similarity to 36 *Streptomyces* NRBC, specifically to the *Streptomyces griseus* group, which has activity against *Kocuria rhizophila* and *Aspergillus oryzae*, and produces compounds such as streptomycin and bafilomycin, with antibacterial and antifungal activity, respectively. Yuan and Crawford (1995) pointed to mechanisms of *Streptomyces lydicus*

Cuadro 4. Características fenotípicas de actinomicetos seleccionados por su mayor actividad inhibitoria de fitopatógenos de *Solanum tuberosum*.

Table 4. Phenotypic characteristics of Actinomycetes selected by the most inhibitory activity of pathogenic of *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Pigmento del micelio aéreo	Pigmento del micelio substrato	Elevación	Textura
AACI – 5	Grisáceo	No	Si	Pulverulenta
ACZI – 22	Blanquecino	No	Si	Seca
ACZII – 35	Blanco-grisáceo	No	Si	Rugosa
ACZIII – 84	Verdoso, con borde blanquecino	Marrón-verdoso	Si	Rugosa
ACZIII – 88	Blanquecino	Amarillento	Si	Seca

Según la literatura consultada, el género *Streptomyces* es el principal responsable en la producción de la mayoría de los metabolitos bioactivos. En particular, *Streptomyces* forma parte de un grupo importante dentro de los actinomicetos, porque éstos son capaces de producir varios tipos de metabolitos secundarios (Baltz, 2006).

WYEC108 (isolated from the rhizosphere of plants) for controlling *Pythium ultimum* through antifungal compounds and extracellular chitinase, which destroy not only the spores, but also damage the hyphal cell wall; this showed that *S. lydicus* WYEC108 has biocontrol potential against *P. ultimum*.

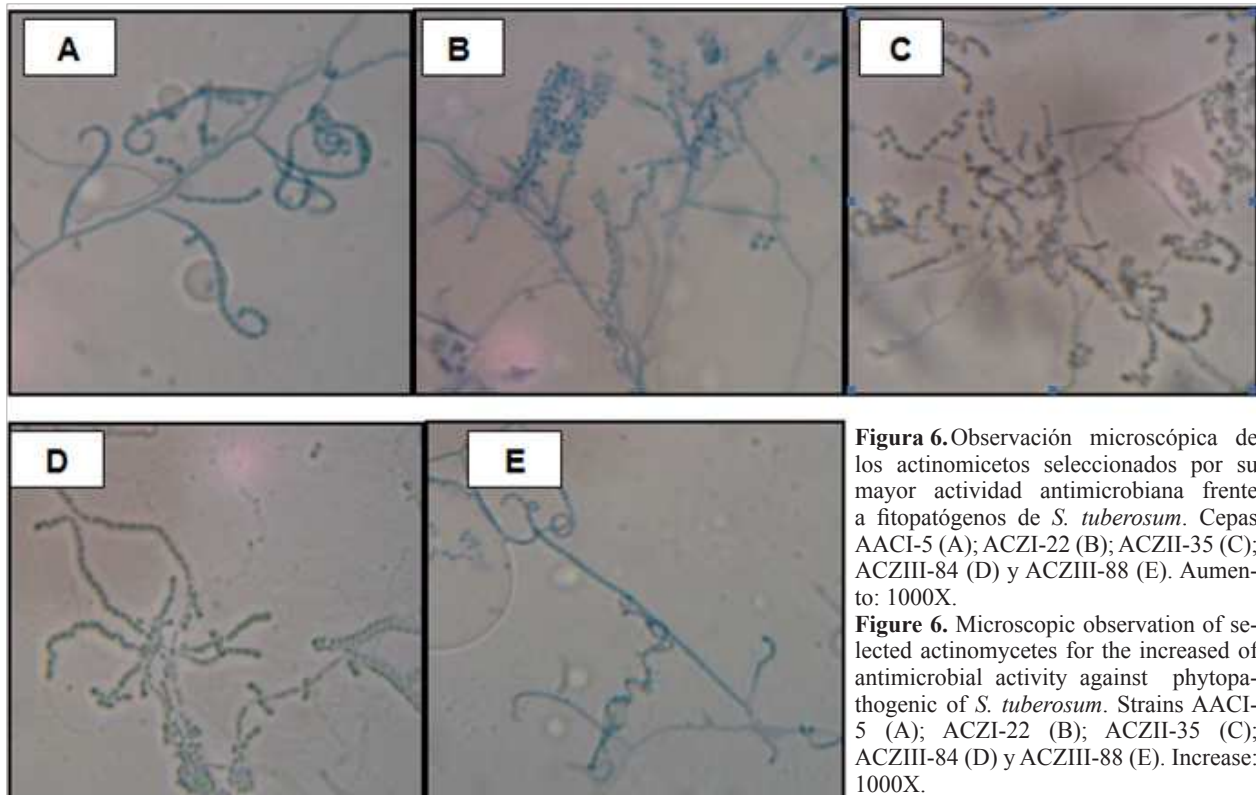


Figura 6. Observación microscópica de los actinomicetos seleccionados por su mayor actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos de *S. tuberosum*. Cepas AACI-5 (A); ACZI-22 (B); ACZII-35 (C); ACZIII-84 (D) y ACZIII-88 (E). Aumento: 1000X.

Figure 6. Microscopic observation of selected actinomycetes for the increased of antimicrobial activity against phytopathogenic of *S. tuberosum*. Strains AACI-5 (A); ACZI-22 (B); ACZII-35 (C); ACZIII-84 (D) y ACZIII-88 (E). Increase: 1000X.

Pero no solo *Streptomyces* habita en el suelo, incluido el compost; también otros géneros de actinomicetos como lo reportaron Remya y Vijayakumar (2008); quienes de 64 colonias de actinomicetos, identificaron *Streptomyces* (30) (47%), *Glicomyces* (10), *Nocardiosis* (7), *Nocardiodes* (4), *Actinopolispora* (3), *Nocardia* (3), *Kibdelosporangium* (2), *Actinosinnema* (1), *Kineosporia* (1) y *Saccharopolyspora* (1). De igual manera, Nakashima *et al.* (2009) aislaron 800 cepas de actinomicetos, los cuales fueron comparados con cepas de NBRC (National Biological Reserch Center), 64 de ellas mostraron similitud con 36 *Streptomyces* NRBC, específicamente al grupo *Streptomyces griseus*, con actividad frente a *Kocuria rhizophila* y *Aspergillus oryzae*; además productoras de compuestos como streptomycin y bafilomicin con actividad antibacteriana y antifúngica, respectivamente. Yuan y Crawford (1995) señalaron mecanismos de *Streptomyces lydicus* WYEC108 (aislado de la rizósfera de plantas) en el control de *Pythium ultimum* a través de antifúngicos y quitinasa extracelular que destruye no solo las esporas, también dañan la pared celular de las hifas, demostrando que *S. lydicus* WYEC108 tiene potencial biocontrolador sobre *P. ultimum*.

Obtención del extracto crudo y actividad antimicrobiana. Los extractos obtenidos después del cultivo y posterior obtención con solventes orgánicos fueron concentrados hasta obtener los pesos secos de cada cepa (Cuadro 5). La extracción de compuestos activos se realizó utilizando dos solventes de polaridad distinta como son el diclorometano (DCM) y el acetato de etilo (EtAC). Se observó ligera variación en la recuperación de extractos crudos; en este caso los extractos de EtAC mostraron cierta ventaja a los del DCM. Asimismo, en cuanto al rendimiento antimicrobiano, el extracto recuperado con EtAC tuvo mejor actividad inhibitoria que

Obtention of crude extract and antimicrobial activity. The extracts obtained after the culture with organic solvents were concentrated until obtaining the dry weight of each strain (Table 5). The extraction of active compounds was carried out using two solvents of different polarity: dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtAc). We observed a slight variation in the recovery of crude extracts; in this case, the EtAC extracts showed a certain advantage over DCM extracts. Likewise, regarding the antimicrobial performance, the extract recovered with EtAc had better inhibitory activity than the DCM extract. Leiva *et al.* (2004) selected 13 strains out of a total of 31 actinomycetes in order to obtain extracts using 5 solvents of increasing polarity; these were petroleum ether, chloroform, ethyl methyl ketone, ethyl acetate and butanol; the most active extracts were those obtained with ethyl methyl ketone and ethyl acetate. In addition, Remya and Vijayakumar (2008) used extracts obtained with ethyl acetate, methanol, chloroform and ethanol against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*; the ethyl acetate extract showed the greatest inhibition capacity. Other authors such as Dhanasekaran *et al.* (2005) obtained different results with extracts obtained

Cuadro 5. Extracto crudo obtenido del cultivo de las cepas seleccionadas.

Table 5. Crude extract obtained from selected crop strains.

Actinomicetos	Peso seco (mg)	
	Acetato de etilo	Diclorometano
AACI – 5	9.0	2.5
ACZI – 22	11.5	16.3
ACZII – 35	2.2	2.8
ACZIII – 84	9.2	3.2
ACZIII – 88	30.7	4.3

el de DCM. Leiva *et al.* (2004) seleccionaron 13 cepas de un total 31 actinomicetos para obtener extractos con 5 solventes de polaridad creciente; éstos fueron éter de petróleo, cloroformo, etilmetilcetona, acetato de etilo y butanol; siendo los extractos más activos los obtenidos con etilmetilcetona y acetato de etilo. Asimismo, Remya y Vijayakumar (2008) utilizaron extractos obtenidos con acetato de etilo, metanol, cloroformo y etanol frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*; siendo el extracto de acetato de etilo el de mayor capacidad de inhibición. Otros autores como Dhanasekaran *et al.* (2005), obtuvieron resultados distintos a partir de extractos con anilina, cloroformo, piridina y acetato de etilo frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* y *B. subtilis*; sin embargo, los extractos de acetato de etilo fueron los que generaron mejores resultados. Narayana *et al.* (2008) separaron 4 fracciones bioactivas del extracto crudo de acetato de etilo de *Streptomyces* sp. y los enfrentó a hongos fitopatógenos, resultando *Fusarium udum* y *Penicillium citrinum* susceptible a las 4 fracciones, mientras *Fusarium oxysporum* mostró resistencia a una de las fracciones. En este sentido, nuestros resultados ratifican al EtAC como uno de los mejores solventes en la recuperación de metabolitos bioactivos de actinomicetos. La actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos con los dos solventes fue evidente tanto para las bacterias como los hongos patógenos de la papa. Algunos resultados de estas pruebas se pueden observar en la Figura 7. Respecto a la actividad antimicrobiana de los actinomicetos existen diversos trabajos que señalan su producción durante la fase exponencial final y la estacionaria. Prapagdee *et al.* (2008) aislaron *S. hygrosopicus* productor de un potente inhibidor de fitopatógenos; estos productos fueron una quiti-

with aniline, chloroform, pyridine and ethyl acetate against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* and *B. subtilis*, but the ethyl acetate extracts had the best results. Narayana *et al.* (2008) separated 4 bioactive fractions from the crude ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. and confronted them with phytopathogenic fungi; *Fusarium udum* and *Penicillium citrinum* showed susceptibility to the 4 fractions, while *Fusarium oxysporum* showed resistance to one of the fractions. In this respect, our results confirm the EtAC as one of the best solvents for recovering bioactive metabolites from actinomyces. The antimicrobial activity of the crude extracts obtained with the two solvents was evident both in bacterial and fungal pathogens of potato. Some results of these tests can be seen in Figure 7. Regarding the antimicrobial activity of actinomyces, there are several studies that indicate its presence during the final exponential and stationary phases. Prapagdee *et al.* (2008) isolated *S. hygrosopicus*, which produces potent inhibitory compounds of plant pathogens; these compounds are an extracellular chitinase and a β -1,3-glucanase produced during the exponential and late exponential phases, respectively. According to Joo (2005), *Streptomyces halstedii* AJ-7 produces a cellular chitinase that causes abnormal morphologies in fungal hyphae, growth aberrations, hyphal swelling and cell wall lysis. Farfan and Gutierrez (2009) note that there may be synergy between chitinase-type enzymes and other antifungal metabolites in the inhibition process of fungal pathogens.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of extracts of actinomyces against plant pathogens. The results of this test are show in Table 6. We used extracts of AACI-5 and ACZII-35 to determine the MIC of *P. carotovorum* and *R.*

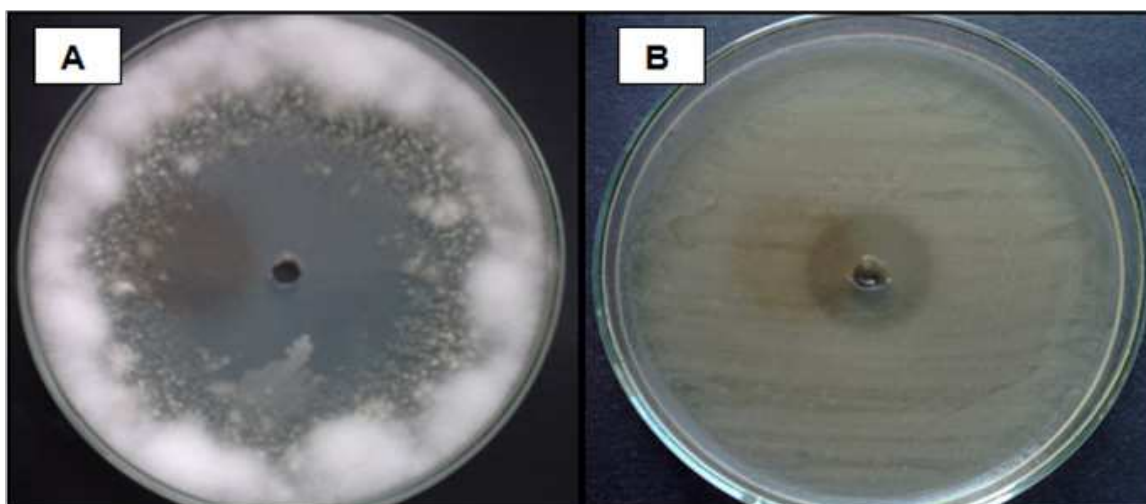


Figura 7. Actividad inhibitoria del extracto obtenido con Acetato de Etilo a partir de la cepa ACZIII-88 frente a *Fusarium sp.*, (A) y de la cepa ACZII-35 frente a *Pectobacterium carotovorum* (B).

Figure 7. Inhibitory activity of the extract obtained with Ethyl Acetate from the strain ACZIII-88 compared to a *Fusarium sp.*, (A) and strain ACZII-35 compared to *Pectobacterium carotovorum* (B).

nasa extracelular y una β -1,3-glucanasa producida durante la fase exponencial y exponencial tardía respectivamente. Según Joo (2005), *Streptomyces halstedii* AJ-7 produce una quitinasa celular, la cual causa en las hifas de los hongos morfologías anormales, aberraciones en su crecimiento, hinchazón de las hifas y lisis de la pared celular. Farfán y Gutiérrez (2009) señalan que es posible que exista sinergismo en el proceso de inhibición de los hongos fitopatógenos entre enzimas tipo quitinasas y otros metabolitos antifúngicos.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos de actinomicetos frente a fitopatógenos.

Los resultados de esta prueba se observan en la Cuadro 6. Se utilizaron los extractos de AACI-5 y ACZII-35 para determinar la CMI de *P. carotovorum* y *R. solanacearum*. La concentración inicial para los extractos de EtAC y DCM fue de 2 mg.mL⁻¹. En términos generales, se puede afirmar que el extracto DCM de la cepa ACZII-35 tuvo mejor rendimiento, alcanzando una CMI de

solanacearum. The initial concentration of the EtAC and DCM extracts was 2 mg.mL⁻¹. Overall, we can say that the DCM extract of the ACZII-35 strain had a better performance, reaching a MIC of 0.125 mg.mL⁻¹ against *R. solanacearum*, while the EtAC extract of the AACI-5 strain reached a MIC of 0.2 mg.mL⁻¹ against *P. carotovorum*. To determine the MIC of *Fusarium sp.*, we chose the extracts of the strains ACZIII-84 and ACZIII-88, with an initial concentration of 2 mg.mL⁻¹. Both extracts showed low performance (Table 6). For the MIC of *R. solani*, we used the extracts of ACZI-22 and ACZIII-88 with an initial concentration of 2 mg.mL⁻¹. The results indicate that inhibiting this pathogen required 0.125 mg.mL⁻¹ of the DCM extract of the ACZIII-88 strain. The other extracts achieved poor results. Finally, the extracts of AACI-5 and ACZIII-88 were used to determine the MIC of *P. infestans*; both extracts had an initial concentration of 4 mg.mL⁻¹. In this case, the extracts showed good performance at fairly low concentrations; only 0.0625 mg.mL⁻¹

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (mg.ml⁻¹) de extractos crudos de actinomicetos.
Table 6. Minimum Inhibitory Concentration (mg.ml⁻¹) of crude extracts of actinomycetes.

Patógenos	Actinomicetos									
	AACI-5		ACZI-22		ACZII-35		ACZIII-84		ACZIII-88	
	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM
<i>R. solanacearum</i>	0.25	(-)	ND	ND	0.5	0.125	ND	ND	ND	ND
<i>P. carotovorum</i>	0.2	(-)	ND	ND	1	0.25	ND	ND	ND	ND
<i>R. solani</i>	ND	ND	0.5	1.0	ND	ND	ND	ND	0.5	0.125
<i>Fusarium</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	(-)	(-)	1	2
<i>P. infestans</i>	0.063	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.125	0.125

Extractos: EtAC (Acetato de Etilo); DCM (Diclorometano); (-) Negativo; ND: no determinado / EtAC (Ethyl acetate); DCM (dichloromethane); (-) Negative; ND: undetermined.

0.125 mg.mL⁻¹ frente *R. solanacearum*; en tanto que para *P. carotovorum* fue el extracto EtAC de la cepa AACI-5 que alcanzó una CMI de 0.2 mg.mL⁻¹. Para determinar la CMI de *Fusarium* sp. se eligió los extractos de las cepas ACZIII-84 y ACZIII-88, siendo la concentración inicial de 2 mg.mL⁻¹. El rendimiento de ambos extractos fue bajo (Cuadro 6). En el caso de la CMI de *R. solani* se utilizaron los extractos de ACZI-22 y ACZIII-88 con una concentración inicial de 2 mg.mL⁻¹. Los resultados señalan que para inhibir a este patógeno fue necesario 0.125 mg.mL⁻¹ del extracto DCM de la cepa ACZIII-88. Los otros extractos alcanzaron resultados bajos. Finalmente, los extractos de AACI-5 y ACZIII-88 se utilizaron para determinar la CMI de *P. infestans*; siendo la concentración inicial para ambos extractos de 4 mg.mL⁻¹. En este caso los extractos mostraron buen rendimiento a concentraciones bastante bajas, siendo suficiente 0.0625 mg.mL⁻¹ (62.5 µg.mL⁻¹) del extracto EtCA de la cepa AACI-5 para inhibir el desarrollo del oomiceto *P. infestans*. Trabajos similares al presente fueron realizados por Narayana *et al.* (2008), quienes determinaron la CMI de 4 fracciones del compuesto bioactivo de *Streptomyces* sp. ANU 6277 frente

(62.5 µg.mL⁻¹) of the EtCA extract of the AACI-5 strain was required to inhibit the growth of the oomycete *P. infestans*. Similar studies to this one were conducted by Narayana *et al.* (2008), who determined the MIC of 4 fractions of the bioactive compound of *Streptomyces* sp., ANU 6277, against *F. udum*, *Penicillium citrinum* and *F. oxysporum*, all of which were susceptible to the AF3 fraction at concentrations of 2, 5 and 10 µg.mL⁻¹, respectively. Taechowisan *et al.* (2005) determined the MICs of two fractions, (i) and (ii), of the bioactive compound of *Streptomyces aureofaciens*, CMUAc 130, against *Colletotrichum musae*; the values were 120 and 150 µg.mL⁻¹, respectively.

Although in this study the MIC was evaluated from crude extract containing the bioactive compound, other authors, such as Taechowisan *et al.* (2005) and Narayana *et al.* (2008), evaluated the MIC from purified fractions, and thus the inhibitory activity was more efficient. Preliminary *in vitro* assays allow to know if the microorganisms are good antagonists, in order to evaluate their possible use in *in vivo* assays, as proposed by Bittencourt *et al.* (1998), who evaluated 190 actinomycetes isolated from rhizosphere of tomato against

a *F. udum*, *Penicillium citrinum* y *F. oxysporum*, resultando susceptibles a la fracción AF3 a concentraciones de 2, 5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Taechowisan *et al.* (2005) determinaron la CMI de dos fracciones (i) y (ii) del compuesto bioactivo de *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 frente a *Colletotrichum musae*, siendo estos valores de 120 y 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Si bien, en este trabajo la CMI se evaluó a partir del extracto crudo que contenía el compuesto bioactivo, otros autores como Taechowisan *et al.* (2005) y Narayana *et al.* (2008), evaluaron la CMI a partir de fracciones purificadas, por lo tanto la actividad inhibitoria fue más eficiente. Los ensayos *in vitro* son preliminares para saber si los microorganismos son buenos antagonistas y de esta manera evaluar su posible uso en ensayos *in vivo*, tal como plantearon Bittencourt *et al.* (1998), quienes evaluaron 190 actinomicetos aislados de rizosfera de tomate frente a *Ralstonia solanacearum*, de los cuales 18 mostraron 100% de efectividad, siendo la mejor vía de inoculación en semillas o raíces. Tuomi *et al.* (2001) aplicaron a través de un sistema de irrigación para el control de patógenos importantes como *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*.

CONCLUSIÓN

Este estudio demuestra que cepas de actinomicetos aislados de compost poseen un relevante antagonismo contra importante fitopatógenos fúngicos y bacterianos de *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. Esto permite afirmar que representan posibles candidatos para ser utilizados en programas de control biológico, en la producción de dicho cultivo, como parte de una práctica de agricultura sostenible.

Ralstonia solanacearum, of which 18 were 100% effective; the best inoculation pathways were seeds and roots. Tuomi *et al.* (2001) applied antagonistic microorganisms through an irrigation system to control important pathogens such as *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*.

CONCLUSION

This study demonstrates that actinomycete strains isolated from compost have significant antagonistic capacity against important fungal and bacterial phytopathogens of *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. This allows us to affirm that they are possible candidates for use in biological control programs in the production of this crop as part of sustainable agriculture practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Vicerrectorado de Investigación (VRI) of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Peru for funding through the program of work Undergraduate Thesis, 2010 (RR No. 01746-R-10).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación (VRI) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú por su financiamiento a través del Programa de Trabajos de Tesis de Pregrado, 2010 (RR N° 01746-R-10).

## LITERATURA CITADA

- AL-Zaharani S. 2007. Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Japan. Science Journal of King Abdulaziz University 19(1): 127-138.
- Arios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press, New York, USA. 992p.
- Arslan E, Obek E, Kirbag S, Ipek U and TOPAL M. 2008. Determination of the effect of compost on soil microorganisms. International Journal of Science and Technology 3(2): 151-159.
- Baltz R. 2006. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? Journal Indian Microbiology Biotechnology 33: 507-513.
- Bittencourt A y Da Silva R. 1999. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum*. Ciencia y Agrotecnología Lavras 23(2): 281-288.
- Bittencourt A, Da Silva R and Prata M. 1998. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. Pesqueria Agropecuaria Brasília 33 (12): 2065-2072.
- Bobadilla C y Rincón S. 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos "plaza". Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.
- Caviedes L, Delgado J and Gilman R. 2002. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology 40(5): 1873-1874.
- Crowford D, Lynch J, Whipps J and Ousley M. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogens. Applied and Environmental Microbiology 59: 3899-3905.
- De Boer B, Gunnewiek K, Lafeber P, Janse J, Spit B and Wolvendorp J. 1998. Antifungal properties of dune soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry 30: 193-203.
- Dhanasekaran D, Rajakumar G, Sivamani P, Selvamani R, Panneerselvam A and Thajuddin N. 2005. Screening of Salt Pans actinomycetes for antibacterial agents. The Internet Journal of Microbiology 1(2): 6-12.
- Dopazo C, Lemos M, Lodeiros C, Bolinches J, Barja J and Toranzo A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. Journal Applied Bacteriology 65(2): 97-101.
- Duque C and Quintana M. 2008. Determinación preliminar de la actividad promotora de crecimiento vegetal de actinomicetos aislados del suelo. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Elphinstone J. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa. *Erwinia* sp. Boletín de información técnica 21. Lima: Centro Internacional de la Papa, 18p.
- Ezziyyani M, Perez C, Requena M, Rubio L y Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* - ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
- FAO (Food and Agricultural Organization). 2008. Material de propagación de calidad declarada. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal 195. p79. <http://www.fao.org/news/archive/news-by-date/2014/en/>
- Farfán D y Gutierrez C. 2009. Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagonico sobre microorganismos fitopatogenos. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis para optar al Grado de Doctor. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Granada-España.
- Franco-Correa M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Revista Peruana de Biología 16(2): 239-242.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P and Chhatpar H. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. African Journal of Biotechnology 5: 54-72.
- Gonzalez-Franco A, Deobald L, Spiak A and Crawford D. 2003. Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. Canadian Journal of Microbiology 49: 683-698.
- Goodfellow M and Williams S. 1983. Ecology of Actinomycetes. Annual Reviews Microbiology 37: 189-216.
- Gurung T, Sherpa C, Prasad V and Lekhak B. 2009. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology 10: 173-182.
- He L, Sequeira L and Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67:1357-1361.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J and Williams S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed. Maryland: Williams & Wilkins. Baltimore. p 800.
- Horna-Agueda J. 1996. Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de Actinomicetos nativos de sedimentos marinos de Ancón y Pisco. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima-Perú.
- Ikeda J, Saito H, Sato S and Kodama T. 2000. Growth-inhibition effect of *Streptomyces* sp. 39L40C to mulberry twig blight pathogen *Fusarium lateritium*. The Journal of Sericultural Science of Japan 69: 163-168.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2014. Nota de prensa: Producción de papa creció en 45%. Informe de la Presidencia del Consejo de Ministros, Perú. <http://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-papa-crecio-45-7582/>
- Iznaga Y, Lemus M, Gonzales L, Garmendia L, Nadal L and Vallin C. 2004. Antifungal activity of actinomycetes from Cuban soils. Phytopherapy Reserch 18: 494-496.
- Joo G. 2005. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. Biotechnology 27: 201-205.
- Kathiresan K, Balagurunathan R and Masilamani M. 2005. Fungicidal activity of marine actinomycetes against Phytopathogenic fungi. Indian Journal of Biotechnology 4: 271-276.

- Leiva S, Yañez M, Zaror L, Rodriguez H y García H. 2004. Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. *Revista Médica de Chile* 132: 151-159.
- León J, Liza L, Soto I, Cuadra D, Patiño L y Zerpa R. 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana Biología* 14(2): 259-270.
- Liu C, Westley J, Herman T, Prasser B, Palleroni N, Evans R and Miller P. 1986. Novel polyether antibiotics, X-14873 A, G and H produced by *Streptomyces*. Taxonomy of the producing culture, fermentation, biological and ionophore properties of the antibiotics. *Journal of Antibiotics* 39(12): 1712-1718.
- Nakashima T, Anzai K, Suzuki R, Kuwahar N, Takeshita S, Kanamoto A and Ando K. 2009. Productivity of bioactive compounds in *Streptomyces* species isolated from Nagasaki marine environments. *The Society for Actinomycetes Japan* 23(1): 16-20.
- Narayana K, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y and Krishna S. 2008. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology* 57(1): 35-39.
- Ningthoujam D, Sanasam S, Tamreihao K, Nimaichand S. 2009. Antagonistic activities of local Actinomycetes isolates against rice fungal pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3(11): 737-742.
- Oskay M, Usame A and Azeri C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 3(9): 441-446.
- Oskay M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology* 8(13): 3007-3017.
- Pandey B, Ghimire P and Agarwal V. 2004. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. *Journal Biology Science* 23: 44-53.
- Park J, El-Tarabily K, Ghisalberti E and Sivasithamparam K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Applied Microbiology* 35: 361-365.
- Pérez N. 2004. Control biológico de patógenos vegetales. *Manejo Ecológico de Plagas* 7: 231-247.
- Prapagdee B, Kuekulvong C and Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences* 4: 330-337.
- Reinozo Y, Casadeus L, García A, Gutierrez J y Pazos V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10(3): 187-191.
- Remya M and Vijayakumar R. 2008. Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from West Coast of India. *Medicine and Biology* 15(1): 13-19.
- Rothrock C and Gottlieb D. 1981. Importance of antibiotics production antagonism of selected *Streptomyces* strains to two soilborne plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* 34:830-835.
- Serrano L y Galindo E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 58(1): 77-88.
- Sultan M, Khatune N, Sathi Z, Bluiyan S, Choudury M, Sadik G, Gafur M and Rahman A. 2002. *In vitro* antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. *Biotechnology Research* 1(2): 100-106.
- Taechowisan T, Lu C and Shen Y. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology Research* 151: 1691-1695.
- Toledo D. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* sp. en el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Tesis de Grado. Universidad de Talca. Chile.
- Torres H. 2002. Manual de enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, p 59.
- Tuomi T, Heino M, Nordstrom K and Laakso S. 2001. Fiber fractions from processing of barley in production and conservation of a biology control agent. *Applied Biochemical Biotechnology* 94(2): 135-145.
- Valois D, Fayad K, Barasubiye T, Garon M, Dery C, Brzezinski R, Singh P, Shin Y, Park C and Chung Y. 1996. Biological control of *Fusarium* wilt of *Cucurbit* by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89(1): 92-99.
- Whipps J. 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52(1): 487-511.
- Yabuuchi E, Kosato Y, Yano I, Hotta H and Nishiuchi Y. 1995. Transfer of Two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleronii and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb.nov.and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969). *Microbiology and Immunology* 39(11): 897-904.
- Yuan W and Crawford D. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108. As a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied Environment Microbiology* 61(8): 3119-3128.

# Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of litchi fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, México

## Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Soon.) en Oaxaca, México

Misael Martínez Bolaños\*, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Rosario Izapa. Km. 18 carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla chico, Chiapas; Daniel Téliz Ortiz, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Antonio Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Guadalupe Valdovinos Ponce, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Daniel Nieto Ángel, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Eliseo García Pérez, Colegio de Postgraduados, km. 88.5 carretera Xalapa-Veracruz, CP 91690 Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Mexico; Vladimir Sánchez López, Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec. Circuito Central # 200. Colonia Parque Industrial. CP 68301, Tuxtepec, México. \*Autor de correspondencia: misael1480@hotmail.com

Recibido: Noviembre 20, 2014.

Aceptado: Junio 28, 2015.

Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E y Sánchez-López V. 2015. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Litchi Fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 140-155.

**Abstract.** Anthracnose of litchi fruits was characterized by internal and external brown circular lesions with well-defined margins on the pericarp, but not on the aril or seed. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were isolated from symptomatic fruit pericarp samples of cultivars Mauritius and Brewster in 2008-2010 cycles. *Colletotrichum* sp. (51 %) and *Pestalotiopsis* sp. (17 %) were isolated more frequently from symptomatic fruit pericarp samples of cultivar Mauritius in 2009. *Colletotrichum* sp. was isolated on PDA (39 %) and in semi-selective medium (59 %) from symptomatic Mauritius fruit pericarp samples in 2010, and from asymptomatic pericarp Brewster samples in 2009

**Resumen.** La antracnosis de frutos de litchi se caracterizó como lesiones internas y externas, oscuras, circulares con márgenes definidos en el pericarpio, pero no en el arilo y semilla. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., y *Lasiodiplodia* sp., se aislaron de muestras de pericarpio sintomático de los cultivares Mauritius y Brewster en los ciclos 2008-2010. *Colletotrichum* sp. (51 %) y *Pestalotiopsis* sp. (17 %) se aislaron más frecuentemente de muestras de pericarpio de frutos sintomáticos del cultivar Mauritius en 2009. *Colletotrichum* sp., se aisló en PDA (39 %) y en medio semiselectivo (59 %) de muestras de pericarpio sintomático en el cultivar Mauritius en 2010, y de pericarpio asintomático del cultivar en 2009 (32 %) y 2010 (21 %) sobre PDA y 10% en medio semiselectivo; sin embargo no se aisló de pericarpio asintomático del cultivar Mauritius en ninguno de los dos años de cosecha.

Sólo *Colletotrichum* sp., reprodujo la enfermedad en laboratorio (17 de 20 frutos inoculados) y

(32 %) and 2010 (21 %) on PDA and 10 % in semi-selective medium; however it was not isolated from asymptomatic Mauritius pericarp in neither of the two harvesting years. Only *Colletotrichum* sp., reproduced the disease in the laboratory (17 out of 20 inoculated fruits) and in the field (19 out of 20 inoculated fruits). The fungus was morphologically and molecularly identified as *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

**Keywords:** Brewster, incidence, Mauritius, pathogenicity, PCR, pericarp.

## INTRODUCTION

Litchi (*Litchi chinensis* Soon) is a subtropical fruit (Coates *et al.*, 1994) native to southern China and southeast Asia; its pericarp is thin and rough, and when fruits get ripe, it becomes red and cracked due to the presence of brachysclereids, which could be associated with protection against mechanical damage or physiological stress (Nacif *et al.*, 2001). The aril is white and covers a dark brown seed.

The main problems in litchi production are low or irregular yields due to excessive fruit drop (Mitra *et al.*, 2005); oxidation and cracking of the pericarp (Huang *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005); pest damages caused by *C. gloeosporioides* Penz (Campbell and Campbell, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko, *Tessaratomya papillosa* Drury and *Dasineura* sp., and high harvesting and packaging costs (Xu *et al.*, 2005).

Litchi production in Mexico is 19,888.05 tons, in an area of 3,738.48 hectares (SIAP, 2013). In Oaxaca, Mexico, Brewster and Mauritius cultivars are commercially grown in the Papaloapan and Bajos Mixes regions, respectively. In both cultivars, a regular dark brown spot on the pericarp represents one of the main problems under field

en campo (19 de 20 frutos inoculados). El hongo se identificó morfológica y molecularmente como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

**Palabras clave:** Brewster, incidencia, Mauritius, patogenicidad, PCR, pericarpio.

## INTRODUCCIÓN

El litchi (*Litchi chinensis* Soon) es un fruto subtropical (Coates *et al.*, 1994) nativo del sur de China y sureste de Asia; su pericarpio es delgado y áspero, y cuando madura es de color rojo y con coartaduras debido a la presencia de braquiesclereidas, cuya función podría estar asociada con la protección contra daños mecánicos o estrés fisiológico (Nacif *et al.*, 2001). El arilo es blanco y cubre una semilla marrón oscuro.

Los principales problemas en la producción del litchi son rendimientos bajos o irregulares debido a caída excesiva de frutos (Mitra, *et al.*, 2005); oxidación y coartadura del pericarpio (Huang *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005); daños por plagas causados por *C. gloeosporioides* Penz (Campbell y Campbell, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko, *Tessaratomya papillosa* Drury y *Dasineura* sp., y costos altos en cosecha y empaque (Xu *et al.*, 2005).

La producción de litchi en México es de 19,888.05 toneladas, en un área de 3,738.48 hectáreas (SIAP, 2013). En Oaxaca, México, los cultivares Brewster y Mauritius se siembran comercialmente en la región del Papaloapan y los Bajos Mixes, respectivamente. En ambos cultivares, una mancha oscura regular en el pericarpio representa uno de los principales problemas en condiciones de campo y postcosecha. Los síntomas en campo se caracterizan como lesiones semicirculares café y secas; el arilo y semilla no muestran daño. No se

and postharvest conditions. Field symptoms are characterized by brown and dry semicircular lesions; the aril and seed show no damages. No records have been found about its cause and importance in Mexico so far; however, Oaxaca farmers report damages of up to 50% in production. Taking in to account the socioeconomic importance of this problem, the objective of this study was to determine the etiology of the brown spot of litchi fruits in Oaxaca, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was established in commercial litchi orchards in three counties of Oaxaca State during the 2008-2010 production cycles. Brewster and Mauritius cultivars were evaluated in San Jose Chiltepec (17° 57' 57.92" N, 96° 10' 11.68" W), and in San Juan Cotzocón (17° 26' 07.74" N, 95° 19' 53.97" W) and Loma Bonita (17° 58' 53.1" N, 95° 50' 58.1" W), respectively.

**Symptoms and fungi characterization.** Symptomatic (natural infection) and asymptomatic commercial ripe fruits from Brewster and Mauritius cultivars were collected in May 2009 in one commercial litchi orchard in San José Chiltepec and San Juan Cotzocón, respectively. One hundred fruits from each cultivar were randomly collected from 25 trees and then, washed with soap and water in the laboratory, air dried at room temperature, and longitudinally sectioned. Symptom consistency, shape, and color were evaluated on pericarp, aril, seed, and peduncle, as well as the presence of chlorotic haloes and signs of associated microorganisms.

To characterize fungal isolates, 123 symptomatic and 195 asymptomatic Brewster fruits were harvested in 2008-2009, and 60 and 70 in 2009-2010. Then, 193 symptomatic and 72 asymptomatic

han encontrado registros de su causa o importancia en México hasta ahora; sin embargo, productores de Oaxaca reportan daños superiores a 50% en producción. Por la importancia socioeconómica de este problema, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología del manchado café en frutos de litchi en Oaxaca, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en huertos comerciales de litchi en tres municipios de Oaxaca, México durante los ciclos de producción 2008-2010. Los cultivares Brewster y Mauritius se evaluaron en San José Chiltepec (17° 57' 57.92" N y 96° 10' 11.68" O), y en San Juan Cotzocón (17° 26' 07.74" N y 95° 19' 53.97" O) y Loma Bonita (17° 58' 53.1" N y 95° 50' 58.1" O), respectivamente.

**Síntomas y caracterización de hongos.** Los frutos sintomáticos (infección natural) y asintomáticos de los cultivares Brewster y Mauritius en madurez comercial, se colectaron en mayo de 2009 de una parcela comercial de litchi en San José Chiltepec y San Juan Cotzocón, respectivamente. Cien frutos de cada cultivar se colectaron de manera aleatoria a partir de 25 árboles, posteriormente se lavaron con jabón y agua en laboratorio, se secaron a temperatura ambiente y se seccionaron longitudinalmente. En el pericarpio, arilo, semilla y pedúnculo se evaluó la consistencia del síntoma, su forma y color, así como la presencia de halo clorótico y signos de microorganismos asociados.

Para la caracterización de hongos aislados, se cosecharon 123 frutos sintomáticos y 195 asintomáticos del cultivar Brewster en el ciclo 2008-2009, y 60 y 70 en 2009-2010. Además, se muestrearon 193 frutos sintomáticos y 72 asintomáticos del cultivar Mauritius en el ciclo 2008-2009, y 102 y 96 en 2009-2010.

Mauritius fruits were sampled in 2008-2009, and 102 and 96 in 2009-2010. Two 1.5 cm<sup>2</sup> sections of pericarp and aril were dissected from each fruit and disinfested in 1.5 % sodium hypochlorite for three min, rinsed three times in distilled water for 1 min each, and dried with sterile paper towels. Tissue sections were cultured on PDA (Bioxon™) and on a *Colletotrichum* semi-selective medium [19.5 g PDA, 7.5 g agar (Merck™), 8 mg iprodione, 20 mg triadimefon, 50 mg chloramphenicol (Merck™), and 200 mg streptomycin] (Davis, 2003) for 5-7 days at 25 °C under fluorescent light. Fungal growths were purified by hyphal tip and monoconidial cultures.

**Pathogenicity tests.** *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, and *Lasiodiplodia* were isolated from all the Brewster and Mauritius pericarp symptomatic samples and their pathogenicity was tested under laboratory and field conditions.

Laboratory pathogenicity test was evaluated in asymptomatic and commercially ripe Mauritius fruit collected in field in May 2010. Twenty disinfested fruits were wounded with a sterile needle and a 0.5 cm agar disc with *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, or *Lasiodiplodia* was placed on each wound (Johnson and Cooke, 2002). Control fruits (mockinoculated) were inoculated with a 0.5 cm agar disc without mycelia. All inoculated fruits were maintained under humidity chamber conditions at 28 °C±2 for 7 days. Observations were done every 24 h to detect symptoms.

Pathogenicity under field conditions was evaluated in May and June 2010 on 20 asymptomatic Mauritius fruits per tree (5 fruits/cardinal point). Two development stages were evaluated: at the beginning of ripening, and commercially ripe fruits. Fruits were disinfested with 70 % ethanol and wounded with a sterile needle in the middle of the fruit and at the base of the peduncle. Fruits were

Dos secciones de pericarpio y arilo de 1.5 cm<sup>2</sup> se cortaron de cada fruto y se desinfectaron en hipoclorito de sodio por tres minutos, se enjuagaron tres veces en agua destilada por un minuto cada uno, y se secaron en papel estéril. Las porciones de tejido se incubaron en PDA (Bioxon™) y en un medio semi-selectivo a *Colletotrichum* [19.5 g PDA, 7.5 g agar (Merck™), 8 mg iprodione, 20 mg triadimefón, 50 mg chloramphenicol (Merck™), y 200 mg estreptomycin] (Davis, 2003) durante 5-7 días a 25° C bajo luz fluorescente. Los crecimientos de hongos se purificaron por punta de hifa y cultivos monoconidiales.

**Pruebas de patogenicidad.** *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, y *Lasiodiplodia* se aislaron de todas las muestras de pericarpio sintomáticas de los cultivares Brewster y Mauritius y se patogenicidad fue evaluada en condiciones de laboratorio y campo.

Las pruebas de patogenicidad en laboratorio se evaluaron en frutos asintomáticos y en madurez comercial del cultivar Mauritius colectados en campo en mayo de 2010. Veinte frutos desinfectados fueron heridos con una aguja estéril y en cada herida se les colocó un disco de 0.5 cm de agar con *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, o *Lasiodiplodia* (Johnson y Cooke, 2002). Los frutos de control (testigos) fueron inoculados con un disco de agar de 0.5 cm sin micelio. Todos los frutos inoculados se mantuvieron en condiciones de cámara húmeda a 28 °C ±2 por 7 días. Las observaciones se realizaron cada 24 h para detectar síntomas.

La patogenicidad en campo se evaluó en mayo y junio de 2010 en 20 frutos asintomáticos por árbol del cultivar Mauritius (5 frutos/punto cardinal). Dos etapas de desarrollo se evaluaron: frutos en el inicio de maduración, y en madurez comercial. Los frutos se desinfectaron con etanol 70 % y heridos con aguja estéril en la mitad del fruto y en la



individually inoculated at evening (18:00 – 20:00 central time) by injecting 0.5 ml of a  $1 \times 10^6$  conidia. ml<sup>-1</sup> suspension of *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* or sterile distilled water (mockinoculated) (Dinh *et al.*, 2003). Inoculated wounds were covered with wet sterile cotton for 24 h to create high humidity conditions for fungal growth. Symptom development was registered for 15 days. Re-isolates from laboratory and field infected fruits were made to verify Koch's postulates.

**Morphological characterization of the pathogen.** Four out of 256 *Colletotrichum* isolates obtained from symptomatic fruits were selected based on their mycelia growth and spore production, and designed as M26, M28, M29, and M30. Genus (Sutton, 1980; Hanlin, 1990; Barnett and Hunter, 2006) and species (Sutton, 1980; Smith and Black, 1990; Photita *et al.*, 2005) were determined from monoconidial colonies. Appressorium formation was induced on PDA cover slides inoculated individually with M26 and M28-M30 spores (Johnston and Jones, 1997). Appressorium shape and size were characterized a 7 day old fungal culture on PDA.

M26 and M28-M30 growth rates were evaluated for seven days on PDA plates cultured at 28 °C. Data were statistically analyzed by ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) and grouped by Tukey test (SAS, 1997).

**Molecular identification.** M26 and M28-M30 DNA was isolated following the AP method (Sambrook and Russel, 2001). DNA integrity was electrophoresed on a 1% agar gel at 80 volts for 40 min in TBE buffer, and stained with ethidium bromide. ITS1 and ITS2 regions were amplified by PCR with primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990), which amplify a 580 bp

base del pedúnculo. Los frutos fueron inoculados individualmente por la noche (18:00 – 20:00 hora del centro) mediante deposición de 0.5 ml de una suspensión  $1 \times 10^6$  conidios.ml<sup>-1</sup> de *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* o agua destilada estéril (testigo) (Dinh *et al.*, 2003). Los puntos de inoculación se cubrieron con algodón estéril húmedo por 24 h para crear condiciones de alta humedad para el crecimiento de los hongos. El desarrollo de los síntomas se registró por 15 días. Los reaislamientos de los frutos infectados en laboratorio y campo se realizaron para verificar los postulados de Koch.

**Caracterización morfológica del patógeno.** Cuatro de 256 aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de frutos sintomáticos fueron seleccionados con base a su crecimiento miceliar y producción de esporas, e identificados como M26, M28, M29, y M30. El género (Sutton, 1980; Hanlin, 1990; Barnett y Hunter, 2006) y especies (Sutton, 1980; Smith y Black, 1990; Photita *et al.*, 2005) se determinó a través de colonias monoconidiales. La formación de apresorios se indujo en PDA depositado en un portaobjeto e inoculado individualmente con esporas del M26 y M28-M30 (Johnston y Jones, 1997). La forma y tamaño de los apresorios se caracterizó a partir de colonias de hongos de 7 días de edad crecidas en PDA.

Las tasas de crecimiento de M26 y M28-M30 se evaluaron por siete días en placas de PDA incubadas a 28 °C. Los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) y agrupadas por pruebas de Tukey (SAS, 1997).

**Identificación molecular.** M26 y M28-M30 fueron aislados mediante el método AP (Sambrook y Russel, 2001). La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agar 1 % a 80 volts por 40 min en Buffer TBE, y teñido con bromuro de etidio.

fragment. To identify and confirm species, DNA was amplified with ITS4 and the CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') specific primer (Mills *et al.*, 1992), which amplify a 450 bp fragment.

PCR amplification was done in a thermocycler (Applied Biosystems™ 2720) in a 25 µl reaction with 1.0 µl of each primer (10 mM), 1.0 µl of dNTP (10 mM), 5 µl of PCR Buffer 10X, 2.5 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µl of Taq Polymerase, 0.5 µl of DNA and 13.5 µl of nuclease-free water. PCR reactions without tempered were used as negative control.

PCR consisted of an initial denaturation of 5 min at 95 °C followed by 35 cycles of 1 min of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 57 °C, and 1 min of extension at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were electrophoresed on a 1 % agarose gel, purified with the QUIAGEN DNeasy Plant Kit and sequenced in a 3730XL automated sequencer. The sequences were lined up against sequences in the gene bank and homology was determined in the National Center for Biological Information (BLAST, 2011).

## RESULTS

**Symptom characterization.** The Brewster exocarp showed a dark brown lesion without chlorotic halo (Figure 1A). On the endocarp, the lesion was a dark brown circular, and semi-humid depressed spot without chlorotic halo (Figure 1B). On Mauritius exocarp it developed a dark brown well defined lesion with chlorotic halo (Figure 1D); and on the endocarp a dry dark brown non-depressed spot was identified (Figure 1E). None of the Brewster and Mauritius fruits showed damages on the aril (Figure 1C and 1F), seed, or peduncle, and no signs of microorganisms were observed.

**Fungi isolation.** *Colletotrichum* sp., *Pestalotiop-*

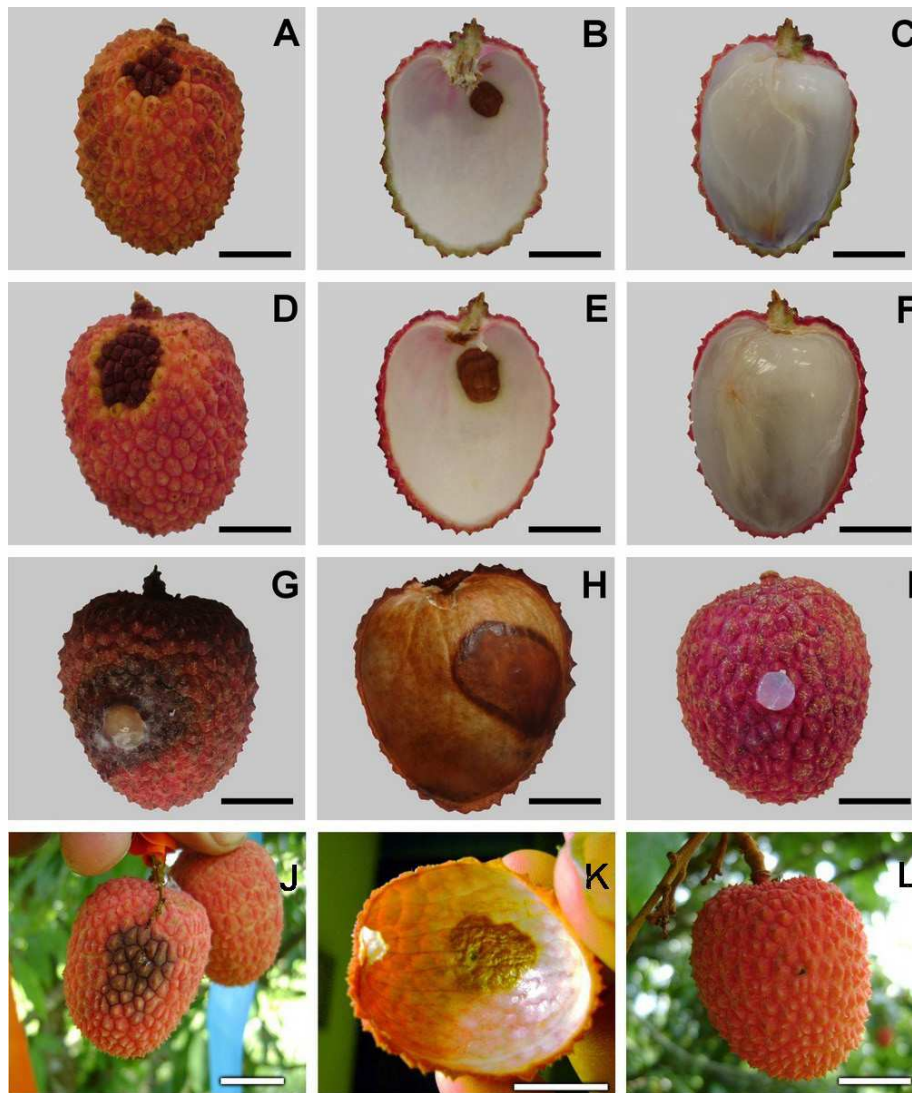
Las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron por PCR con los iniciadores ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990), los cuales amplificaron un fragmento de 580 pb. Para identificar y confirmar especies, el ADN se amplificó con ITS4 y el iniciador específico CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') (Mills *et al.*, 1992), los cuales amplificaron un fragmento de 450 pb.

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador (Applied Biosystems™ 2720) en una reacción de 25 µl con 1.0 µl de cada iniciador (10 nM), 1.0 µl de dNTP (10 nM), 5 µl de Buffer PCR 10X, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 nM), 0.5 µl de Taq Polimerasa, 0.5 µl de ADN y 13.5 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones PCR sin templado se utilizaron como control negativo.

La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de alineamiento a 57 °C, y 1 min de extensión a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos PCR fueron electroforesados en un gel de agarosa 1 %, purificado con el kit QUIAGEN DNeasy Plant y secuenciado en un secuenciador automático 3730XL. Las secuencias fueron alineadas contra secuencias en el banco de genes y su homología se determinó en el Centro Nacional para Información Biológica (BLAST, 2011).

## RESULTADOS

**Caracterización de síntomas.** El exocarpo de Brewster mostró una lesión café oscura sin halo clorótico (Figura 1A). En el endocarpo, la lesión fue una mancha café oscura circular, hundida, semi-húmeda y sin halo clorótico (Figura 1B). En el exocarpo de Mauritius se desarrolló una lesión



**Figure 1.** Litchi fruits (*Litchi chinensis* Soon) with anthracnose symptoms. Brewster cv: A) Pericarp external symptom, B) Asymptomatic aril, C) Pericarp internal symptom. Mauritius cv: D) Pericarp external symptom, E) Asymptomatic aril F) Pericarp internal symptom. Pathogenicity of *C. gloeosporioides* on Mauritius litchi fruits in the laboratory: G) Control fruits, H) Pericarp external symptom, I) Pericarp internal symptom. Pathogenicity on Mauritius litchi fruits in the field: J) Control fruits, K) Pericarp external symptom, L) Pericarp internal symptom. Bar = 1 cm.

**Figura 1.** Frutos de litchi (*Litchi chinensis* Soon) con síntomas de antracnosis. Cultivar Brewster: A) Síntoma externo en pericarpio, B) Arilo asintomático, C) Síntoma interno de pericarpio. Cultivar Mauritius: D) Síntoma externo en pericarpio, E) Arilo asintomático F) Síntoma interno de pericarpio. Patogenicidad de *C. gloeosporioides* en frutos de litchi en laboratorio: G) Frutos de control, H) Síntoma externo de pericarpio, I) Síntoma interno de pericarpio. Patogenicidad en frutos de litchi Mauritius en campo: J) Frutos control, K) Síntoma externo de pericarpio, L) Síntoma interno de pericarpio. Bar = 1 cm.

*sis* sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were isolated from symptomatic Brewster and Mauritius pericarps in the 2008-2009 and 2009-2010 produc-

café obscura bien definida con halo clorótico (Figura 1D); y en el endocarpo se observó una mancha café obscura no húmeda, no hundida (Figura 1E).

tion cycles. However, *Colletotrichum* sp. (256/640 isolates) and *Pestalotiopsis* sp. (71/640 isolates) were isolated more frequently than the other ones (Table 1 and 2). *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were also isolated from Brewster asymptomatic pericarps (Table 1); and *Fusarium* from asymptomatic Mauritius samples (Table 2). *Colletotrichum* sp. grew on more pericarp tissue fragments incubated on semi-selective medium than those cultured on PDA (Table 1 and 2). *Colletotrichum* sp. isolates produced conidia on 4 and on 8-12 day old semi-selective and PDA cultures, respectively. No microorganisms were isolated from aril tissue fragments incubated on both growth media (Table 1 and 2).

In 13 of 15 sections of pericarp incubated in

En ninguno de los frutos de Brewster y Mauritius se observó daños en el arilo (Figura 1C y 1F), semilla, o pedúnculo, y no se observaron signos de microorganismos.

**Aislamiento de hongos.** *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., y *Lasiodiplodia* sp., se aislaron de pericarpios sintomáticos de Brewster y Mauritius en los ciclos de producción 2008-2009 y 2009-2010. Sin embargo, *Colletotrichum* sp. (256/640 aislamientos) y *Pestalotiopsis* sp. (71/640 aislamientos) fueron aislados más frecuentemente que los otros (Cuadro 1 y 2). *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., y *Lasiodiplodia* sp., fueron también aislados de pericarpios asintomáticos de Brewster (Cuadro 1); y *Fusarium* de muestras

**Table 1.** Fungal genera isolates from symptomatic and asymptomatic litchi fruits (Brewster cultivar), in San Jose Chiltepec, Oaxaca.  
**Cuadro 1.** Géneros de hongos aislados de frutos de litchi sintomáticos y asintomáticos (cultivar Brewster), en San José Chiltepec, Oaxaca

| Production cycle   | Tissue/symptoms                           | Growth medium                                                         | Fungal genera (% proportion)                                                                                                             |
|--------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2008-2009          | Pericarp-Anthracnose                      | PDA                                                                   | <i>Colletotrichum</i> 26 % (32/123)<br><i>Pestalotiopsis</i> 15 % (18/123)<br><i>Fusarium</i> 2 % (3/123)                                |
|                    | Aril-Anthracnose<br>Pericarp-Asymptomatic | PDA<br>PDA                                                            | 0 % (0/123)<br><i>Colletotrichum</i> 32 % (62/195)<br><i>Lasiodiplodia</i> 10 % (19/195)<br><i>Pestalotiopsis</i> 1 % (2/195)            |
| 2009-2010          | Aril- Asymptomatic                        | PDA                                                                   | 0 % (0/195)                                                                                                                              |
|                    | Pericarp-Anthracnose                      | PDA                                                                   | <i>Pestalotiopsis</i> 16 % (10/60)<br><i>Colletotrichum</i> 6 % (4/60)                                                                   |
|                    |                                           | Semi-selective                                                        | <i>Colletotrichum</i> 30 % (18/60)<br><i>Lasiodiplodia</i> 15 % (9/60)<br><i>Pestalotiopsis</i> 5 % (3/60)<br><i>Fusarium</i> 2 % (1/60) |
|                    |                                           | PDA                                                                   | 0 % (0/60)                                                                                                                               |
|                    | Aril-Anthracnose                          | Semi-selective                                                        | 0 % (0/60)                                                                                                                               |
|                    | Pericarp-Asymptomatic                     | PDA                                                                   | <i>Colletotrichum</i> 21 % (15/70)<br><i>Pestalotiopsis</i> 11 % (8/70)<br><i>Lasiodiplodia</i> 1 % (1/70)                               |
| Semi-selective     |                                           | <i>Colletotrichum</i> 10 % (7/70)<br><i>Pestalotiopsis</i> 1 % (1/70) |                                                                                                                                          |
| PDA                |                                           | 0 % (0/70)                                                            |                                                                                                                                          |
| Aril- Asymptomatic | Semi-selective                            | 0 % (0/70)                                                            |                                                                                                                                          |

**Table 2.** Fungal genera isolates from symptomatic and asymptomatic litchi fruits (Mauritius cultivar), in San Juan Cotzocón, Oaxaca.  
**Cuadro 2.** Géneros de hongos aislados de frutos de litchi sintomáticos y asintomáticos (cultivar Mauritius), en San Juan Cotzocón, Oaxaca

| Production cycle   | Tissue                | Growth medium  | Fungal genera (% proportion)                                                                                                                   |
|--------------------|-----------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2008-2009          | Pericarp-Anthracnose  | PDA            | <i>Colletotrichum</i> 51 % (99/193)<br><i>Pestalotiopsis</i> 17 % (33/193)<br><i>Fusarium</i> 5 % (10/193)<br><i>Lasiodiplodia</i> 4 % (7/193) |
|                    |                       | PDA            | 0 % (0/193)                                                                                                                                    |
|                    |                       | PDA            | <i>Fusarium</i> 5 % (4/72)                                                                                                                     |
| 2009-2010          | Pericarp-Asymptomatic | PDA            | 0 % (0/72)                                                                                                                                     |
|                    |                       | PDA            | <i>Colletotrichum</i> 39 % (40/102)<br><i>Lasiodiplodia</i> 9 % (9/102)<br><i>Pestalotiopsis</i> 3 % (3/102)<br><i>Fusarium</i> 1 % (1/102)    |
|                    |                       | PDA            | <i>Colletotrichum</i> 62 % (63/102)<br><i>Lasiodiplodia</i> 9 % (9/102)<br><i>Pestalotiopsis</i> 4 % (4/102)                                   |
|                    | Aril-Anthracnose      | PDA            | 0 % (0/102)                                                                                                                                    |
|                    |                       | Semi-selective | 0 % (0/102)                                                                                                                                    |
|                    |                       | PDA            | <i>Fusarium</i> 4 % (4/96)<br><i>Lasiodiplodia</i> 21 % (20/96)<br><i>Pestalotiopsis</i> 10% (10/96)                                           |
|                    | Pericarp-Asymptomatic | Semi-selective | 0 % (0/96)                                                                                                                                     |
|                    |                       | PDA            | 0 % (0/96)                                                                                                                                     |
|                    |                       | Semi-selective | 0 % (0/96)                                                                                                                                     |
| Aril- Asymptomatic | Semi-selective        | 0 % (0/96)     |                                                                                                                                                |
|                    | PDA                   | 0 % (0/96)     |                                                                                                                                                |
|                    | Semi-selective        | 0 % (0/96)     |                                                                                                                                                |

humidity chamber there was conidia production on the fifth day; the salmon colored conidia masses were morphologically identified as *Colletotrichum* sp.

**Pathogenicity tests.** Laboratory test results showed that 85 % (17 out of 20) of the fruits inoculated with *Colletotrichum* sp. developed symptoms on the pericarp similar to those observed in the field. These symptoms appeared 72 h after inoculation as a small light brown circular lesion (Figure 1G). On the endocarp it was developed a dark brown circular and semi-humid lesion (Figure 1H). Mock inoculated fruits (Figure 1I) and fruits inoculated with *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., or *Lasiodiplodia* sp. did not show any symptom.

In the field, symptoms developed in 95 % (19

asintomáticas de Mauritius (Cuadro 2). *Colletotrichum* sp., creció más en los fragmentos de tejido de pericarpio incubados en medio semi-selectivo que los incubados en PDA (Cuadro 1 y 2). Los aislamientos de *Colletotrichum* sp., produjeron conidios en medio semi-selectivo y PDA de 4 y 8-12 días de edad, respectivamente. Ningún microorganismo fue aislado de fragmentos de tejidos de arilo incubados en ambos medios de cultivo (Cuadro 1 y 2). En 13 de 15 fragmentos de pericarpio incubados en cámara húmeda existió producción de conidios al quinto día; las masas de conidios de color salmón se identificaron morfológicamente como *Colletotrichum* sp.

**Pruebas de patogenicidad.** Los resultados en pruebas de laboratorio mostraron que 85 % (17 de

out of 20) of the commercial ripe Mauritius fruits inoculated with *Colletotrichum* sp. on the middle of the pericarp in May, and 90 % in June. Symptoms were observed eight days after inoculation as dark brown lesions on the pericarp (Figure 1J). Symptom on the endocarp was a dark brown circular and depressed lesion (Figure 1K).

Mock inoculated fruits (Figure 1L) and fruits inoculated with *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., or *Lasiodiplodia* sp. did not show any symptoms.

The *Colletotrichum* isolate that induced anthracnose symptoms under laboratory and field conditions was re-isolated and identified morphologically as *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

#### **Pathogen characterization and identification.**

Most (193) of the 256 isolates of *C. gloeosporioides* formed white-light gray scarcely cottony mycelia with abundant bright orange conidial masses in concentric circles (Figure 2A, 2D and 2G). Some (78) of them produced white mycelium with very few conidial masses near to the transference point (Figure 2J). Four out of these 256 isolates were designed as M26, M28, M29 and M30.

M26 and M28-M30 conidia were cylindrical (Table 3 and Figure 2B, 2E, 2H and 2K). M26 conidia were statistically longer than M28 ones, which had the greatest diameter (Table 3). The four isolates formed clavate appressoria (Figure 2C, 2F, 3I and 2L). There were not differences among the mycelium growth rates of the four isolates cultured at 28 °C on PDA ( $\alpha=0.05$ ) (Table 3).

**Molecular identification.** ITS4-ITS5 and ITS4-CgInt primers amplified a fragment of 580 and 450 bp, respectively, which indicated that M26 and M28-M30 isolates belong to *C. gloeosporioides* (Figure 3).

M26 and M28-M30 amplicons were sequenced

20) de los frutos inoculados con *Colletotrichum* sp., desarrollaron síntomas en el pericarpio en forma similar a los observados en campo. Estos síntomas aparecieron 72 h después de la inoculación como lesiones pequeñas circulares de color café brillante (Figura 1G). En el endocarpo se desarrolló una lesión café oscura circular y semi-húmeda (Figura 1H). Los frutos testigo (Figura 1I) y frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., o *Lasiodiplodia* sp., no mostraron ningún síntoma.

En campo, los síntomas se desarrollaron en 95% (19 de 20) de los frutos de Mauritius en madurez comercial inoculados con *Colletotrichum* sp. en la parte media del pericarpio en mayo, y 90% en junio. Los síntomas se observaron ocho días después de la inoculación como lesiones café oscuras en el pericarpio (Figura 1J). Los síntomas en el endocarpo fueron lesiones café oscuras, circulares y hundidas (Figura 1K).

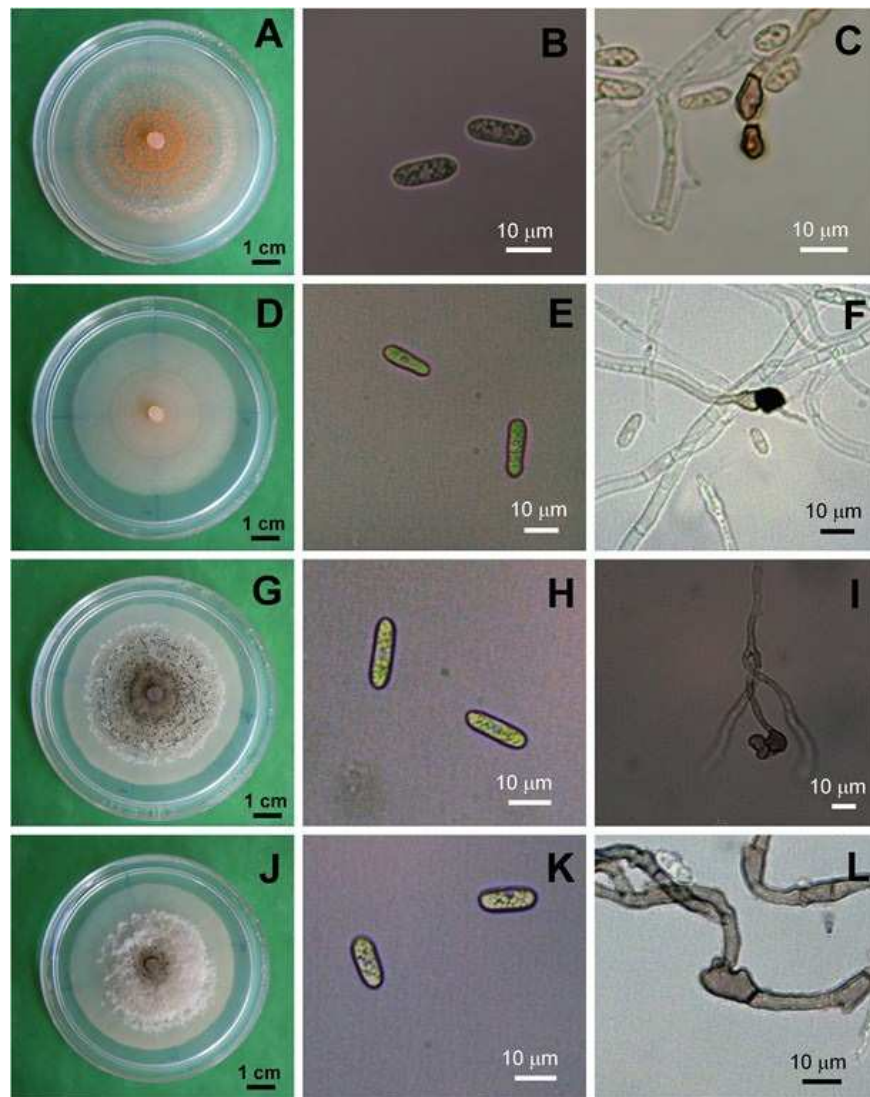
Los frutos testigo (Figura 1L) y frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., o *Lasiodiplodia* sp., no mostraron ningún síntoma.

El aislamiento de *Colletotrichum* que indujo el síntoma de antracnosis en condiciones de laboratorio y campo fue reaislado e identificado como *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

#### **Caracterización e identificación del patógeno.**

La mayoría (193) de los 256 aislamientos de *C. gloeosporioides* formaron micelio blanco-gris claro, ligeramente algodonoso, con abundantes masas de conidios naranja brillante en círculos concéntricos (Figura 2A, 2D y 2G). Algunos (78) de ellos produjeron un micelio blanco con pocas masas conidiales próximas al punto de transferencia (Figura 2J). Cuatro de estos 256 aislamientos fueron designados como M26, M28, M29 y M30.

Los conidios de M26 y M28-M30 fueron cilíndricos (Cuadro 3 y Figura 2B, 2E, 2H y 2K). Los conidios de M26 fueron estadísticamente más



**Figure 2.** Colony Morphology (A,D,G, J), conidia (B, E H, K) and mycelial appressoria (C, F, I, L) of the four representative isolates M26 (A,B,C), 28 (D,E,F), 29 (G,H,I), 30 (J,K,L) of *Colletotrichum gloeosporioides* from litchi fruits, after five days in PDA.

**Figura 2.** Morfología colonial (A, D, G, J), conidios (B, E H, K) y apresorios miceliales (C, F, I, L) de cuatro aislamientos representativos M26 (A, B, C), 28 (D, E, F), 29 (G, H, I), 30 (J, K, L) de *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de litchi, después de cinco días en PDA.

and aligned with those in the GenBank, and gave a homology of 96, 93, 99, and 99 % with *C. gloeosporioides*, respectively (gb/HM016794.1; gb/JF487788.1; gb/JF487788.1; gb/FJ755268.1) (BLAST, 2011).

largos que los de M28, los cuales tuvieron los mayores diámetros (Cuadro 3). Los cuatro aislamientos formaron apresorios clavados (Figura 2C, 2F, 3I y 2L). No existieron diferencias entre las tasas de crecimiento micelial de los cuatro aislamientos incubados a 28 °C en PDA ( $\alpha= 0.05$ ) (Cuadro 3).

**Table 3.** Conidium size and mycelium growth rate of M26 and M28-M30 *C. gloeosporioides* isolates obtained from litchi fruits with anthracnose symptoms in San Jose Chiltepec and Loma Bonita, Oaxaca (2009-2010 production cycle).

**Cuadro 3.** Tamaño de conidio y tasas de crecimiento micelial de los aislamientos M26 y M28-M30 de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi con síntomas de antracnosis en San José Chiltepec y Loma Bonita, Oaxaca (ciclo de producción 2009-2010).

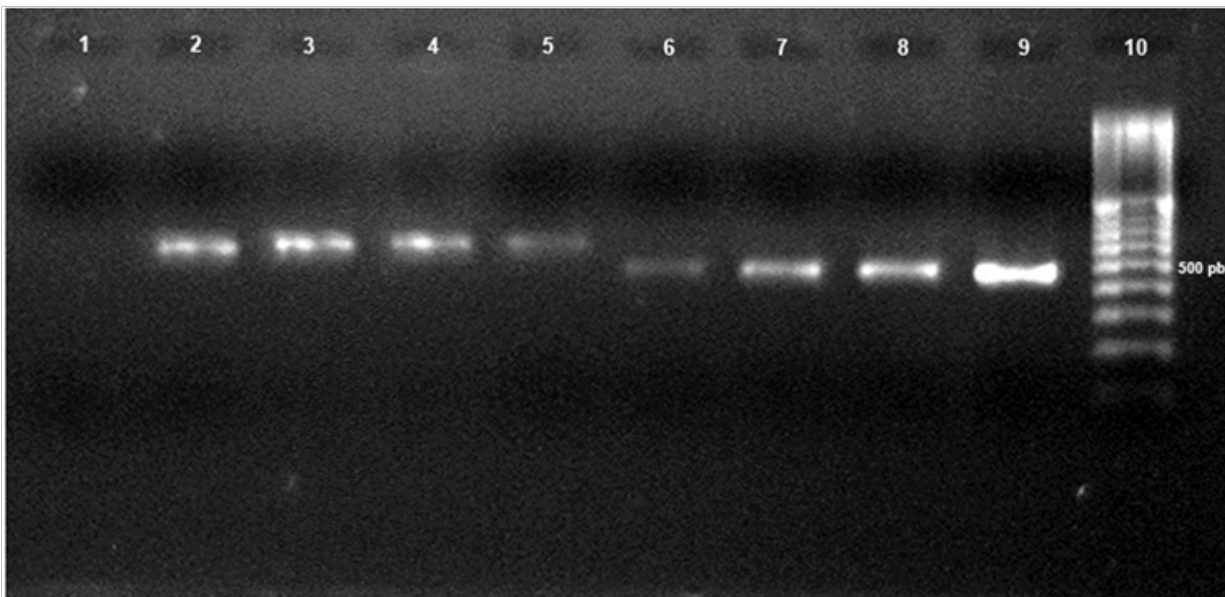
| Isolate | Length (µm) <sup>x</sup> |      |                    | Diameter (µm) <sup>x</sup> |     |                  | Mycelium growth (mm/day) <sup>x</sup><br>PDA/28 °C |
|---------|--------------------------|------|--------------------|----------------------------|-----|------------------|----------------------------------------------------|
|         | Min                      | Max  | Aver.              | Min                        | Max | Aver.            |                                                    |
| M26     | 11.1                     | 20.8 | 15.7 <sup>a</sup>  | 3.4                        | 6.6 | 4.9 <sup>b</sup> | 10.74 <sup>a</sup>                                 |
| M28     | 11.4                     | 17.2 | 14.4 <sup>b</sup>  | 4.2                        | 7.1 | 5.6 <sup>a</sup> | 8.41 <sup>a</sup>                                  |
| M29     | 11.5                     | 17.8 | 15.0 <sup>ab</sup> | 3.7                        | 5.7 | 4.8 <sup>b</sup> | 9.52 <sup>a</sup>                                  |
| M30     | 11.0                     | 17.4 | 14.9 <sup>ab</sup> | 4.0                        | 5.8 | 4.7 <sup>b</sup> | 9.34 <sup>a</sup>                                  |

<sup>x</sup> Values with the same letter in each row are statistically the same, Tukey (P≤0.05) / <sup>x</sup> Valores con las misma letra en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey (P≤0.05).

## DISCUSSION

The results of this study indicate that *C. gloeosporioides* is the causal agent of anthracnose disease in pre-harvest litchi fruits of Brewster and

**Identificación molecular.** Los iniciadores ITS4-ITS5 e ITS4-CgInt amplificaron un fragmento de 580 y 450 pb, respectivamente, lo cual indicó que los aislamientos M26 y M28-M30 corresponden a *C. gloeosporioides* (Figura 3).



**Figure 3.** PCR product of four characteristic isolates (M26, M28, M29, and M30) of *Colletotrichum gloeosporioides*. Lines: 1) Control (H<sub>2</sub>O PCR); 2) M26- ITS4/ITS5; 3) M28- ITS4/ITS5; 4) M29- ITS4/ITS5; 5) M30- ITS4/ITS5; 6) M26- ITS4-CgInt; 7) M28- ITS4-CgInt; 8) M29- ITS4-CgInt; 9) M30- ITS4-CgInt; 10) 100 base pair (bp) marker (Invitrogen).

**Figura 3.** Producto de PCR de cuatro aislamientos característicos (M26, M28, M29, y M30) de *Colletotrichum gloeosporioides*. Líneas: 1) Control (H<sub>2</sub>O PCR); 2) M26- ITS4/ITS5; 3) M28- ITS4/ITS5; 4) M29- ITS4/ITS5; 5) M30- ITS4/ITS5; 6) M26- ITS4-CgInt; 7) M28- ITS4-CgInt; 8) M29- ITS4-CgInt; 9) M30- ITS4-CgInt; 10) marcador de 100 pares de bases (bp) (Invitrogen).



Mauritius cultivars in Oaxaca, Mexico. The fungus was isolated from natural and artificially infected fruits of both cultivars, and formed a cottony white to light gray mycelial growth with salmon colored conidial masses on PDA. Symptoms on inoculated fruits were very similar to those observed in field with natural infection.

In this research, *Colletotrichum* was also isolated from asymptomatic Brewster fruits; similar results were reported by Ann *et al.*, (2004), who isolated *C. gloeosporioides* from asymptomatic flowers and immature fruits of the *Black leaf* litchi cultivar. Once fruits were harvested and stored, they developed anthracnose symptoms, suggesting that this pathogen attacks litchi through latent infections. We consider the probable endophytic nature of *C. gloeosporioides* in the field.

As mentioned before, litchi anthracnose has been consigned mainly as a postharvest disease (Coates *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2003, and Liu *et al.*, 2006) that results from quiescent infections (Li *et al.*, 2005); however, this fungus has been reported as the causal agent of the peduncle rot and *pepper spotting* on litchi fruits under field conditions in Australia (Cooke *et al.*, 2009). Others causes of pericarp browning at postharvest are moisture loss due to desiccation of the pericarp (Chen and Hong, 1992; Underhill and Critchley, 1993), degradation of anthocyanins and oxidation of phenolic substrates by polyphenol oxydase (Underhill and Critchley, 1993) and/or peroxidase enzymes (Zhang and Quantick, 1997).

Species of *Colletotrichum* cannot be recognized by host range (Sutton, 1980, 1992), so identification and characterization of the isolates obtained in this study were done based on morphological characteristics (Smith and Black, 1990; Gunnell and Gubler, 1992; Sutton, 1992). According to those criteria four out of 256 isolates of *Colletotrichum* spp. were selected (M26, M28-M30) and identified

Las ampliaciones de M26 y M28-M30 fueron secuenciadas y alineadas con las del GenBank, y dieron una homología del 96, 93, 99 y 99% con *C. gloeosporioides*, respectivamente (gb/HM016794.1; gb/JF487788.1; gb/JF487788.1; gb/FJ755268.1) (BLAST, 2011).

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que *C. gloeosporioides* es el agente causal de la antracnosis en pre-cosecha de frutos de litchi de los cultivares Brewster y Mauritius en Oaxaca, México. Los hongos fueron aislados de frutos infectados de manera natural y artificial de ambos cultivares, y formaron un crecimiento micelial algodonoso blanco a gris claro con masas conidiales de color salmón en PDA. Los síntomas en frutos inoculados fueron muy similares a los observados en campo con infecciones naturales.

En esta investigación, *Colletotrichum* fue también aislado de frutos asintomáticos de Brewster; resultados similares fueron reportados por Ann *et al.*, (2004), quienes aislaron *C. gloeosporioides* de flores asintomáticas y frutos inmaduros de litchi cultivar *Black leaf*. Una vez que los frutos se cosecharon y almacenaron, desarrollaron síntomas de antracnosis, lo que sugirió que este patógeno ataca al litchi a través de infecciones latentes. Nosotros consideramos la probable naturaleza endofítica de *C. gloeosporioides* en campo.

Como se mencionó antes, la antracnosis de litchi ha sido consignada principalmente como una enfermedad postcosecha (Coates *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2003, y Liu *et al.*, 2006) que resulta de infecciones quiescentes (Li *et al.*, 2005); sin embargo, este hongo se ha reportado como agente causal de la pudrición del pedúnculo y del síntoma de *pepper spotting* en frutos de litchi en condiciones de campo

as *C. gloeosporioides* Penz; their micelial growth pattern agree with that described by Alvarez (1949); however, according to Smith and Black (1990) and Gunnell and Gluber (1992), this growth is similar to *C. fragariae* grown on PDA, but *C. fragariae* cultures on cornmeal, oatmeal, or bean-lime agar plates are dark with concentric circles and pink colored conidial masses (Brooks, 1931). In addition, the average size of the M26, and M28-M30 conidia were shorter and wider than those reported in *C. fragariae* (Smith and Black, 1990; Gunnell and Gubler, 1992).

Based on PCR amplifications through specific species primers, M26 and M28-M30 species were corroborated as *C. gloeosporioides* with a 95-100% similarity with sequences reported for the same species in the gene bank (Freeman *et al.*, 2000).

## CONCLUSIONS

Anthrachnose symptoms observed in litchi fruits in Oaxaca were caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. The disease was characterized by dark-brown and circular dry lesions on the exocarp and endocarp, but neither in the aril nor seed. This is the first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as the causal agent of anthracnose of litchi fruits (*Litchi chinensis*) in Oaxaca, México.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support to this project from Fundación Produce Oaxaca A.C.

## LITERATURE CITED

Alvarez GLA. 1949. Anthracnose of the Annonaceae in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 33: 27-43.

en Australia (Cooke *et al.*, 2009). Otras causas del obscurecimiento del pericarpio en postcosecha son la pérdida de humedad debido a la disecación del pericarpio (Chen y Hong, 1992; Underhill y Critchley, 1993), degradación de antocianinas y oxidación de sustratos fenólicos por las enzimas oxidasa polifenol (Underhill y Critchley, 1993) y/o peroxidasa (Zhang y Quantick, 1997).

Las especies de *Colletotrichum* no se pueden reconocer por el rango de hospederos (Sutton, 1980, 1992), por ello la identificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en este estudio se realizó basado en características morfológicas (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992; Sutton, 1992). De acuerdo a estos criterios cuatro de los 256 aislamientos de *Colletotrichum* spp., fueron seleccionados (M26, M28-M30) e identificados como *C. gloeosporioides* Penz; su patrón de crecimiento miceliar concuerda con los descrito por Alvarez (1949); sin embargo, de acuerdo a Smith y Black (1990) y Gunnell y Gluber (1992), este crecimiento es similar a *C. fragariae* incubado en PDA, sin embargo las colonias de *C. fragariae* en placas de harina de maíz, harina de avena, o frijol-lima-agar son oscuras con círculos concéntricos y masas conidiales de color rosa (Brooks, 1931). Además, el tamaño promedio de los conidios de M26 y M28-M30 fueron más cortos y más anchos que los reportados en *C. fragariae* (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992).

Basado en las amplificaciones de PCR a través de iniciadores específicos, las especies M26 y M28-M30 se corroboraron como *C. gloeosporioides* con una similaridad del 95-100% con secuencias reportadas para la misma especie en el banco de genes (Freeman *et al.*, 2000).

- Ann PJ, Tsai JN, Wang IT and Young HR. 2004. Litchi fruit anthracnose and the cause of black skin. *Plant Pathology Bulletin* 13: 299-308.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minnesota. The American Phytopathological Society Press. 218 p.
- BLAST®. Basic Local Alignment Search Tool. Available at: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Accessed on July 13, 2011.
- Brooks AN. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp. *Phytopathology* 21: 739-744.
- Campbell RJ and Campbell CW. 2001. Evaluation and introduction of lychee cultivars in South Florida, USA. *Acta Horticulturae* 558: 119-123.
- Chen HJ and Hong QZ. 1992. A study on the senescence and browning in the pericarp of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) during storage. *Acta Horticulturae Sinica* 19: 227-232.
- Coates LM, Johnson GI, Sardud U and Cooke AW. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. In: Johnson GL and Highley E (Eds.) *Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits: A Workshop Held*. Bangkok: ACIAR. pp. 68-69.
- Cooke T, Persley D and House S. 2009. *Diseases of Fruit Crops in Australia*. Queensland. CSIRO Publishing. Pp: 145-148.
- Davis MJ. 2003. Lychee anthracnose inoculum sources. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 116: 12-15.
- Dinh SQ, Chongwungse J, Pongam P and Sangchote S. 2003. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology* 32: 533-538.
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymon M and Shabi E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.
- Gunnell PS and Gubler WD. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic on strawberry. *Mycologia* 84: 157-165.
- Hanlin RT. 1990. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Minnesota. American Phytopathological Society Press. 263 p.
- Huang X, Li J, Wang H, Huang H and Gao F. 2001. The relationship between fruit cracking and calcium in litchi pericarp. *Acta Horticulturae* 558: 209-215.
- Johnson GI and Cooke AW. 2002. Postharvest disease control in Lychee. *Acta Horticulturae* 575: 705-715.
- Johnston PR and Jones D. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420-430.
- Li X, Liu A and Chen W. 2005. Studies on development and control of anthracnose of lychee fruit before and after harvest. *Acta Horticulturae* 665: 409-413.
- Liu A, Chen W and Li X. 2006. Developments of anthracnose on harvested litchi fruits and the effects of the disease on storage of the fruits. *Acta Phytopathologica Sinica* 33: 351-356.
- Liu A, Chen W and Li XY. 2003. Biological characteristics of the pathogenic fungus causing anthracnose of litchi. *Acta Phytopathologica Sinica* 33: 313-316.

## CONCLUSIONES

Los síntomas de antracnosis observados en frutos de litchi en Oaxaca fueron causados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. La enfermedad se caracterizó por lesiones café obscuras y circulares en el exocarpo y endocarpo, pero no en el arilo ni semilla. Este es el primer reporte *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal de antracnosis de frutos de litchi (*Litchi chinensis*) en Oaxaca, México.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero para este Proyecto de la Fundación Produce Oaxaca A.C.

~~~~~Fin de la versión en Español~~~~~

- Mills PR, Sreenivasaprasad S and Brown AE. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 98: 137-144.
- Mitra SK, Pereira LS, Pathak PK and Majumdar D. 2005. Fruit abscission pattern on lychee cultivars. *Acta Horticulturae* 665: 215-218.
- Nacif SR, Paoli AAS and Salomão LCC. 2001. Morphological and anatomical development of the litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Brewster). *Fruits* 56: 225-233.
- Photita W, Taylor PWJ, Ford R, Hyde KD and Lumyong S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Sambrook J and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Third edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 46 p.
- SAS Institute. 1997. *The SAS System for Windows*. Release 6.12. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available at: www.siap.gob.mx/agricultura-producción-anual/. Accessed on June 29, 2015.
- Smith BJ and Black LL. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.
- Sutton BC. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti With Pycnidia Acervuli and Stroma* Surrey. Cabi Publishing. 696 p.
- Sutton BC. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA and Jeger MJ (Eds.)

- Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford. CAB International. pp: 1-26
- Underhill SJR and Critchley C. 1993. Physiological, biochemical and anatomical changes in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during storage. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 68: 327-335.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JH and White TJ (Eds.) PCR Protocols. Academic Press. Pp: 315-322.
- Xu X, Wu Z, Chen W and Su M. 2005. Effect of low temperature on relative enzyme activity and membrane peroxidization of lychee fruits. Acta Horticulturae 665: 359-364.
- Zhang DL and Quantick PC. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. Postharvest Biology and Technology 12: 195-202.

Efecto del acibenzolar S-metil en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum*) infectadas con *Phytophthora capsici* en diferentes edades

Effect of acibenzolar S-methyl on serrano pepper plants (*Capsicum annuum*) infected with *Phytophthora capsici* at different ages

Yesenia Cosme-Velázquez, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México Texcoco, Estado de México, C.P. 56230; **Remigio Anastacio Guzmán-Plazola**¹, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México Texcoco, Estado de México, C.P. 56230; **Sergio Sandoval Islas**, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México Texcoco, Estado de México, C.P. 56230; **Tarcisio Corona Torres**, Programa de Genética, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México Texcoco, Estado de México, C.P. 56230 y **Doricela Mendoza Pérez**, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México Texcoco, Estado de México, C.P. 56230. ¹Correspondencia: (rguzmanp@colpos.mx).

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Julio 01, 2015.

Cosme-Velázquez Y, Guzmán-Plazola RA, Sandoval-Islas S, Corona-Torres T y Mendoza-Pérez D. 2015. Efecto del acibenzolar S-metil en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum*) infectadas con *Phytophthora capsici* en diferentes edades. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 156-172.

Resumen. La marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici*, provoca pérdidas considerables de rendimiento, por lo que se han probado múltiples alternativas de manejo de la enfermedad. La inducción de resistencia sistémica y la resistencia asociada con la edad son alternativas de bajo impacto ambiental que podrían coadyuvar al control de este problema sanitario. En el presente trabajo se investigó si la edad al momento del trasplante, con y sin aplicación de acibenzolar S-metil (ASM), puede ser una estrategia para reducir el efecto de la enfermedad en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Se probaron dosis de 1 mg de ASM/planta aplicadas semanalmente desde una

Abstract. Pepper wilt caused by *Phytophthora capsici* causes considerable yield losses. Multiple alternatives have been tested to control this disease. Systemic resistance and age related resistance are low impact alternatives that could contribute to the control of this plant health problem. In this work, transplanting age, with or without acibenzolar S-methyl (ASM), was tested as a possible strategy to reduce the effects of the disease in serrano pepper plants. One milligram of ASM/plant was sprayed weekly, starting a week before transplanting, to seedlings of age 45, 30, and 15 days after seeding. These treatments were tested in two Serrano cultivars (Camino Real and a creole from Tetela de Ocampo, Puebla) with or without inoculation with any of two *P. capsici* strains. The ASM reduced the area under the disease progress curve but did not inhibit pathogen infection. ASM also reduced the growth level of plants from the three tested ages. Seedlings transplanted 45 days after seeding resulted more susceptible to the disease than younger ones.

semana antes del trasplante a plántulas (trasplantadas a 45, 30 y 15 días después de la siembra) de dos genotipos de chile (Camino Real y criollo de Tetela de Ocampo, Puebla) con o sin inoculación con dos cepas de *P. capsici*. El ASM redujo el área bajo la curva del progreso de la enfermedad pero no inhibió la infección por el patógeno. El ASM también redujo el desarrollo de las plantas en las tres edades evaluadas. Plántulas trasplantadas a 45 días después de la siembra resultaron más susceptibles a la enfermedad que las de edades más jóvenes.

Palabras clave adicionales: viveros, edad de la planta, resistencia sistémica.

La marchitez causada por *Phytophthora capsici* Leonian, es una enfermedad devastadora de cultivos de chile (*Capsicum annuum* L.) y se encuentra presente en todas las áreas productoras del mundo (Morán *et al.*, 2010). Este patógeno puede causar pérdidas de rendimiento de hasta 100 % (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). Una vez que se le detecta en el campo puede hacerse necesaria una combinación de estrategias de rotación de cultivos, fumigación, subsoleo, elevación de camas de siembra, irrigación con agua de pozo, resistencia genética, aplicación de fungicidas, la destrucción de plantas infectadas y cosecha temprana para poder manejar la enfermedad (Granke *et al.*, 2012).

Actualmente existe una fuerte demanda de alternativas ambientalmente aceptables para la protección de cultivos. Entre estas alternativas se encuentra la inducción de resistencia sistémica; en cuyo proceso está involucrada la activación de los mecanismos naturales de defensa de las plantas mediante elicitores generados por los propios patógenos, por otros organismos o por factores ambientales (Carvajal, 2013). La aplicación de productos químicos sintéticos también puede activar procesos fisiológicos y bioquímicos propios de la planta y

Additional keywords: nurseries, plant age, systemic resistance.

Wilt caused by *Phytophthora capsici* Leonian is a devastating disease of pepper crops (*Capsicum annuum* L.) that is found present in all producing zones in the world (Moran *et al.*, 2010). This pathogen can cause yield losses of up to 100 % (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). Once it is detected in the field, it might be necessary to implement a combination of strategies to handle the disease, including crop rotation, fumigation, subsoiling, raising seedbeds, irrigating from well water, genetic resistance, application of fungicides, destruction of infected plants and early harvest (Granke *et al.*, 2012).

Currently, there is a high demand of environmentally acceptable alternatives for crop protection. Among these, the induction of systemic resistance is an alternative whose processes involve the activation of natural defense mechanisms of the plants through elicitors generated by the pathogens themselves, by other organisms, or by environmental factors (Carvajal, 2013). The application of synthetic chemical products can also activate physiological and biochemical processes in the plant and avoid or reduce the progress of diseases (Guevara and Rodriguez-Galvez, 2006). Among these compounds outstands acibenzolar S-methyl (ASM), an inducer of systemic acquired resistance (SAR) which has been studied for plant disease control in the last few years (Buzi *et al.*, 2004). ASM acts as a functional analog of salicylic acid in the SAR signaling pathway and influences the expression of genes and the activity of several enzymes related with resistance as well as the production of lignin and phenol compounds (Malolepsza, 2006). Wilt reduction has been reported with the use of ASM against *P. capsici* in bell pepper (Matheron and Porchas, 2002),

evitar o reducir el progreso de enfermedades (Guevara y Rodríguez-Gálvez, 2006). Entre estos compuestos destaca el acibenzolar S-metil (ASM), un inductor de resistencia sistémica adquirida (SAR) que ha sido estudiado para el control de enfermedades de las plantas en los últimos años (Buzi *et al.*, 2004). EL ASM actúa como un análogo funcional del ácido salicílico en la vía de señalización de la SAR, influencia la expresión de genes y la actividad de varias enzimas relacionadas con la resistencia, así como la producción de lignina y compuestos fenólicos (Malolepsza, 2006). Se ha reportado reducción de la marchitez con la aplicación de ASM contra *P. capsici* en chile pimiento (Matheron y Porchas, 2002), contra *P. cactorum* y *P. fragariae* var *fragariae* en fresa (Eikemo *et al.*, 2003) y contra *P. capsici* en calabaza (Koné *et al.*, 2009). Similarmente, el pre-tratamiento de plántulas de *Curcuma longa* induce SAR contra *Pythium aphanidermatum* (Radhakrishnan *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto del ASM contra *P. capsici* en chile de otras variedades no ha sido bien documentado.

Las plantas pueden cambiar su nivel de resistencia a enfermedades conforme avanza la edad de la planta o la madurez de los tejidos (Develey-Riviere y Galiana, 2007). Estos cambios en resistencia son cada vez más reconocidos como un componente importante de defensa de la planta frente a la infección (Whallen, 2005) y pueden tener implicaciones importantes en la definición de estrategias adecuadas de control. La severidad del daño por *P. capsici* puede variar con la edad de las plántulas (Kim *et al.*, 1989). En cucurbitáceas, frutos de edades avanzadas mostraron una reducción gradual de la susceptibilidad a *P. capsici* con respecto a frutos jóvenes (Ando *et al.*, 2009). Similarmente, frutos de chile (*C. annuum* L.) tuvieron menos infección conforme avanzaron en su proceso de maduración (Biles *et al.*, 1993).

against *P. cactorum* and *P. fragariae* var *fragariae* in strawberries (Eikemo *et al.*, 2003), and against *P. capsici* in squash (Kone *et al.*, 2009). Similarly, the pre-treatment of *Curcuma longa* seedlings induces SAR against *Pythium aphanidermatum* (Radhakrishnan *et al.*, 2011). However, the effect of ASM against *P. capsici* in other pepper varieties has not been well documented.

Plants can modify their level of resistance to diseases as the age of the plant or the maturity of the tissues advances (Develey-Riviere and Galiana, 2007). These changes in resistance are every time more recognized as an important component of plant defense against infection (Whallen, 2005) and may have important implications in the definition of adequate control strategies. The severity of the damage by *P. capsici* may vary with the age of the seedlings (Kim *et al.*, 1989). In cucurbitaceae, older fruits showed a gradual reduction in susceptibility to *P. capsici* with respect to younger fruits (Ando *et al.*, 2009). Similarly, pepper (*C. annuum* L.) fruits are less infected as they advance in their maturation process (Biles *et al.*, 1993).

The joint management of resistance inducers and variation in the age of the seedlings when transplanting are two more elements in managing pepper wilt by *P. capsici* that could contribute to decrease the amount of fungicides used in the production of this crop. In the present work, we evaluated whether the regular application of ASM to plants of different ages at transplanting can be used as a strategy to decrease wilt severity in two cultivars of Serrano pepper.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of the experiments. Every 15 d, pepper (*C. annuum*) seeds of the Camino Real

El manejo conjunto de inductores de resistencia y la variación en la edad de las plántulas al trasplante son dos elementos más en el manejo de la marchitez del chile por *P. capsici* que podrían contribuir a reducir la cantidad de fungicidas empleados en la producción de este cultivo. En el presente trabajo se evaluó si la aplicación regular de ASM a plantas de diferentes edades al trasplante puede ser utilizada como una estrategia de reducción de la severidad de la marchitez en dos cultivares de chile serrano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los experimentos. Se sembraron cada 15 días semillas de chile (*C. annuum*) del cv. híbrido Camino Real (Harris Moran) y de un cultivar criollo de Tetela de Ocampo, Estado de Puebla, México, en vasos de poliuretano de 125 ml con peat moss (PREMIER) más perlita (AGROLITA), esterilizados y en proporción 3:1. Plántulas de 45, 30 y 15 d fueron trasplantadas a macetas de poliuretano con 1 L de suelo de la región productora de chile de la Vega de Metztlán, Hidalgo, México (VMH), donde la marchitez es un problema grave. Como tratamientos se definió un arreglo factorial de los factores: 1) cultivar (Camino Real y criollo de Tetela de Ocampo), 2) edad de las plántulas (trasplantadas a 45, 30 y 15 d después de la siembra), 3) inductor de resistencia (con o sin aplicación de ASM) y 4) inoculación con *P. capsici* (Cepa 1, Cepa 2 y un testigo no inoculado). De esta forma se tuvo un total de 36 combinaciones (2 x 3 x 2 x 3) a evaluar. El experimento fue establecido en condiciones de invernadero, bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones y se realizó dos veces.

En los tratamientos correspondientes se aplicó semanalmente al follaje 1 mg de ASM/planta a

(Harris Moran) hybrid and a creole cultivar from Tetela de Ocampo, Puebla state, Mexico, were planted in 125 ml polyurethane cups with sterilized peat moss (PREMIER) and perlite (AGROLITA) at a 3:1 proportion. The seedlings were transplanted at 45, 30, and 15 d age into polyurethane pots with 1 L soil from the pepper producing region in Vega de Metztlán, Hidalgo, Mexico (VMH), where pepper wilt is a serious problem. To define treatments, a factorial arrangement of the following factors was constructed: 1) cultivar (Camino Real and creole from Tetela de Ocampo), 2) seedling age (transplanted at 45, 30, and 15 d after seeding), 3) resistance inducer (with or without ASM), and 4) *P. capsici* inoculation (Strain 1, Strain 2, and a control without inoculation). A total of 36 combinations (2 x 3 x 2 x 3) were evaluated. The experiment was established under greenhouse conditions, under a completely random design with ten replicates, and it was done twice.

In the corresponding treatments, the leaves were sprayed weekly with 1 mg ASM/plant to the seedlings of all three ages, beginning one week before transplanting and until the end of the experiment (51 d after transplanting). Actigard® 50 (Syngenta) was used as a source of ASM. The inoculation of *P. capsici* was done 45 d after transplantation. The strains used were isolated from Serrano pepper plants from the VMH and they were previously tested as pathogenic in the abovementioned cultivars. Before inoculation, all the plants were irrigated with distilled water. Each seedling was inoculated with 1 mL of a suspension with 10^5 zoospores/mL. The suspension was injected into the base of the stem at a depth of 2 cm. After inoculation, all plants were irrigated until the soil in each pot was saturated. The controls without inoculation were treated with sterile distilled water. Daily temperature conditions in the greenhouse varied from 12 to 35 °C.

plántulas de las tres edades, iniciando una semana antes del trasplante y hasta el término del experimento (51 d después del trasplante). Como fuente de ASM se utilizó el producto Actigard® 50 (Syngenta). La inoculación de *P. capsici* se realizó a los 45 d después del trasplante. Las cepas utilizadas fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH y probadas previamente como patogénicas en los cultivares arriba mencionados. Antes de la inoculación se aplicó un riego con agua destilada a todas las plantas. Cada plántula fue inoculada con 1 mL de una suspensión de 10^5 zoosporas/mL. La suspensión fue inyectada al pie del tallo a una profundidad de 2 cm. Después de la inoculación, se regó hasta saturar el suelo de cada maceta. Los testigos no inoculados fueron tratados con agua destilada estéril. Las condiciones diarias de temperatura en el invernadero variaron de 12 a 35 °C.

VARIABLES EVALUADAS. A partir del trasplante, se evaluó cada tercer día la severidad de la marchitez, la altura de planta y el número de hojas. Al final del experimento se evaluó el peso seco de la parte aérea. La severidad fue evaluada con base en la escala de Morán *et al.* (2010). Con estos resultados se calculó el área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS) mediante el método de integración trapezoidal (Shaner y Finney, 1977). Para la estimación del peso seco de planta, el material vegetal fue colocado en bolsas de papel con perforaciones y secado en una estufa de aire forzado a 70 °C, durante 72 h. Al final del experimento se colectaron segmentos de raíces y se incubaron a temperatura ambiente (24 °C) en medio PARPH (Kannwischer y Mitchell, 1978) y en cajas de Petri con agua destilada estéril para verificar la aparición de micelio cenocítico con esporangios típicos de *P. capsici*.

ANÁLISIS DE DATOS. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante técnicas de análisis

EVALUATED VARIABLES. After transplanting, wilt severity, plant height, and the number of leaves per plant were evaluated every third day. At the end of the experiment, the dry weight of the aerial part was evaluated. The severity was evaluated based on the scale of Moran *et al.* (2010). From these results, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated by means of the trapezoidal integration method (Shaner and Finney, 1977). To estimate the dry weight of the plants, the plant material was placed in perforated paper bags and dried in a forced air oven at 70 °C for 72 h. At the end of the experiment, root segments were collected and incubated at room temperature (24 °C) in PARPH medium (Kannwischer and Mitchell, 1978). Also, root subsamples were placed in Petri dishes with sterile distilled water to verify the occurrence of coenocytic mycelia with sporangia typical of *P. capsici*.

DATA ANALYSIS. The data obtained were analyzed statistically by the variance analysis technique and the Tukey multiple range test (Steel and Torrie, 1980). The information was processed with the SAS (Statistical Analysis System, v. 9.3 Cary, North Carolina) statistical software.

RESULTS

Table 1 shows a summary of the results of the variance analysis for the main variables evaluated in the present work. Figures 1 to 7 report the results for the highest order significant interactions.

Area under the disease progress curve (AUDPC). In experiment 1, the variance analysis indicated highly significant effects of the age X cultivar X resistance inducer X inoculation interaction ($P < 0.0004$). This result indicates that, in general,

de varianza y la prueba de rango múltiple de Tukey (Steel y Torrie, 1980). La información fue procesada mediante el paquete para análisis estadístico SAS (Statistical Analysis System, v. 9.3 Cary, North Carolina).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presenta un resumen de los resultados del análisis de varianza de las principales variables evaluadas en el presente trabajo. En las Figuras 1 a 7 se reportan resultados para las interacciones significativas de mayor orden.

Área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS). En el experimento 1, el análisis

the plants of age 1 (transplanted 45 d after seeding) had a greater AUDPC than those of ages 2 and 3 (transplanted 30 and 15 d) (Figure 1). At age 1, the inoculation with *P. capsici* had a greater AUDPC than the controls with ASM and no inoculation, particularly when the plants were infected with Strain 1 (Figure 1). When ASM was not applied, the differences between treatments with or without inoculation were only significant in the Camino Real cultivar when it was inoculated with Strain 1. With the exception of this treatment, the response pattern among cultivars at this age was similar. In ages 2 and 3, although AUDPC was greater in the inoculated treatments, the difference with respect to the control were only significant in the plants of the Tetela de Ocampo cultivar inoculated with Strain 1, without ASM.

Cuadro 1. Resumen del análisis de varianza ($P > F$) de variables evaluadas en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.).
Table 1. Summary of the variance analysis ($P > F$) of the variables evaluated in Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.).

| Factor | g.l. | Peso seco de la parte aérea | | Área bajo la curva del progreso de la severidad | |
|--------------------------------|------|-----------------------------|---------------|---|---------------|
| | | Experimento 1 | Experimento 2 | Experimento 1 | Experimento 2 |
| Edad ¹ | 2 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| Genotipo ² | 1 | 0.0001 | <.0001 | 0.0378 | 0.4028 |
| Edad*Genotipo | 2 | 0.0162 | 0.0045 | <.0001 | 0.0002 |
| Inductor ³ | 1 | <.0001 | <.0001 | 0.0012 | 0.1636 |
| Edad*Inductor | 2 | 0.8919 | 0.0016 | 0.2513 | 0.0337 |
| Genotipo*Inductor | 1 | 0.0201 | 0.9996 | 0.8157 | 0.3399 |
| Edad*Genotipo*Inductor | 2 | 0.0137* | 0.0069* | 0.2393 | 0.4828 |
| Inóculo ⁴ | 2 | 0.0141 | 0.8722 | <.0001 | <.0001 |
| Edad*Inóculo | 4 | 0.2604 | 0.1566 | 0.0164 | 0.0093 |
| Genotipo*Inóculo | 2 | 0.2717 | 0.1294 | 0.0632 | <.0001 |
| Edad*Genotipo*Inóculo | 4 | 0.023* | 0.6472 | 0.0214 | <.0001** |
| Inductor*Inóculo | 2 | 0.0344* | 0.4614 | 0.4252 | 0.1095 |
| Edad*Inductor*Inóculo | 4 | 0.1309 | 0.3626 | 0.0032 | 0.0015** |
| Genotipo*Inductor*Inóculo | 2 | 0.2105 | 0.6723 | 0.932 | 0.2294 |
| Edad*Genotipo*Inductor*Inóculo | 4 | 0.0762 | 0.4897 | 0.0004** | 0.4027 |

¹Trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra.

²cv Camino Real (Harris Moran), cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla.

³Con acibenzolar S-metil, sin Inductor de resistencia.

⁴Testigo no Inoculado, Cepa 1 y Cepa 2 de *Phytophthora capsici*.

** Interacción utilizada para la comparación de medias y preparación de gráficas.

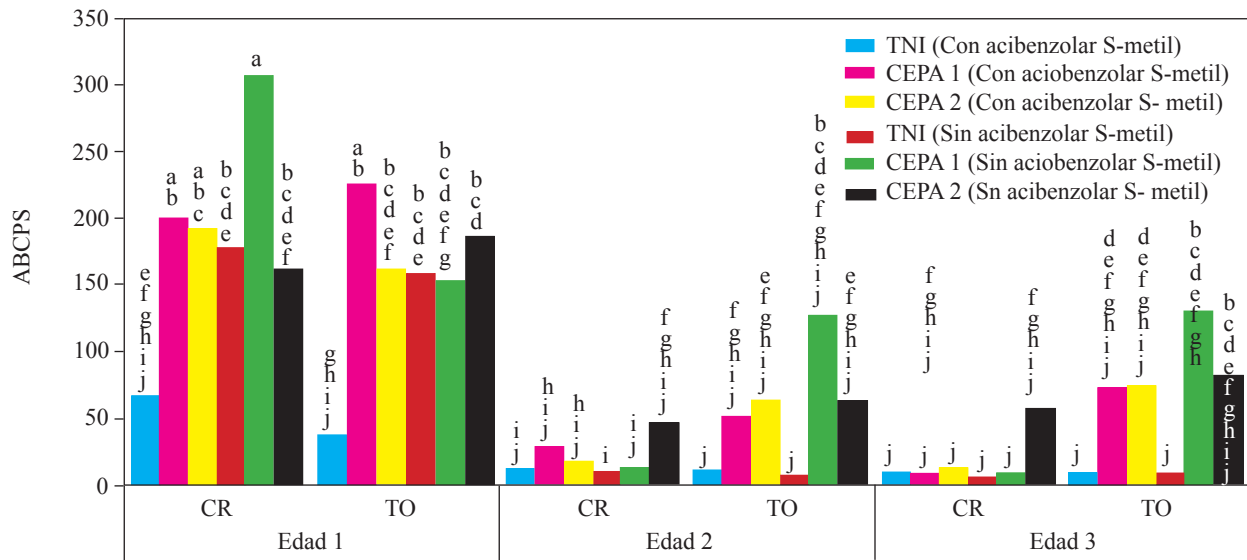


Figura 1. Experimento 1. Efecto de interacción Edad de la planta X Genotipo X Inductor de Resistencia X Inoculación con *Phytophthora capsici* sobre el área bajo la curva del progreso de la severidad de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) cultivado en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Las cepas del oomiceto fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta a los 45 días después del trasplante. Promedios de diez repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.5$). Edad 1, 2 y 3=trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CR = cv Camino Real (Harris Moran). TO=cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla. TNI=testigo no inoculado con *P. capsici*, suelo no esterilizado.

Figure 1. Experiment 1. Effect of the Plant age X Genotype X Resistance inducer X *Phytophthora capsici* inoculation interaction on the area under the disease progress curve of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). The oomycete strains were isolated from Serrano pepper plants from the VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant 45 days after transplanting. Means from ten replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CR = Camino Real (Harris Moran) cv. TO = Tetela de Ocampo, Puebla, creole cv. TNI = control without *P. capsici* inoculation, unsterilized soil.

de varianza indicó efectos altamente significativos de la interacción edad X cultivar X inductor X inoculación ($P < 0.0004$). Este resultado indica que, en general, las plantas de la edad 1 (trasplantadas a 45 d después de la siembra) tuvieron un ABCPS más alto que en las edades 2 y 3 (trasplantadas a 30 y 15 d) (Figura 1). En la edad 1, la inoculación con *P. capsici* produjo una mayor ABCPS que en los testigos no inoculados, con ASM, particularmente cuando las plantas fueron infectadas con la cepa 1 (Figura 1). Cuando no se aplicó ASM las diferencias entre tratamientos con y sin inoculación sólo fueron significativas cuando se aplicó la cepa 1 en

The application of ASM decreased the AUDPC, but not in all cases. At age 1, the Camino Real plants inoculated with Strain 1 of *P. capsici* and the control plants with no inoculation treated with ASM had a lower AUDPC than those not treated with the inducer. However, plants inoculated with Strain 2 showed no decrease in the AUDPC by effect of ASM, and the value of this variable resulted significantly higher than the control without inoculation but with ASM. Plants at ages 2 and 3, with and without ASM, had statistically equal AUDPC.

In experiment 2, the variance analysis indicated highly significant effects of the age X genotype

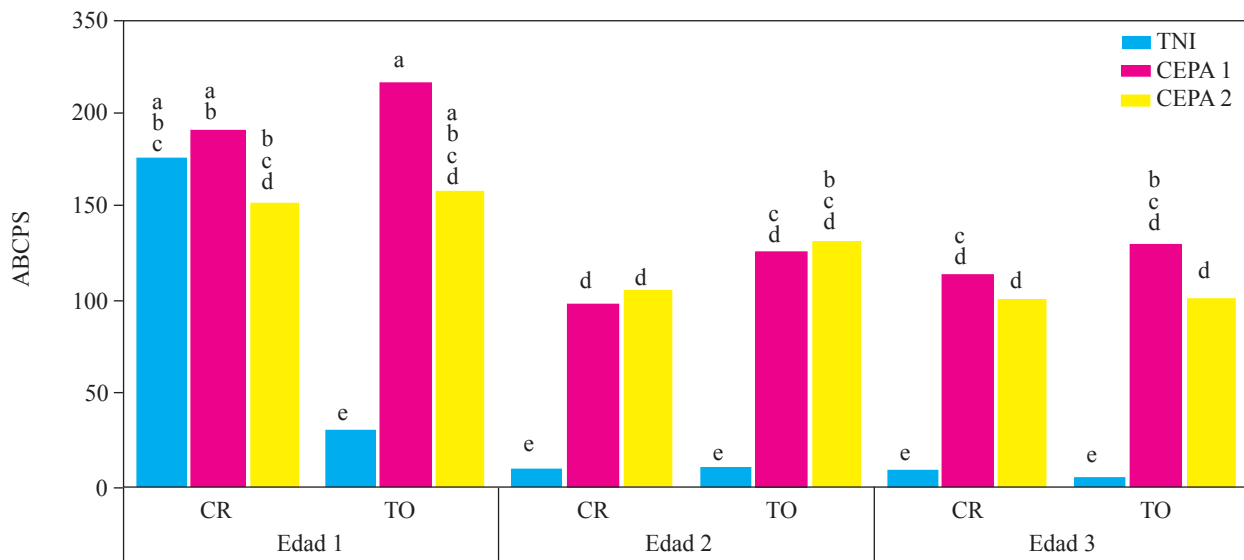


Figura 2. Experimento 2. Efecto de interacción Edad de la planta X Genotipo X Inoculación con *Phytophthora capsici* sobre el área bajo la curva del progreso de la severidad de la marchitez del chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cultivado en suelo no esterilizado de la Vega de Metztitlán Hidalgo (VMH). Las cepas del oomiceto fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta a los 45 días después del trasplante. Medias de veinte repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.5$). Edad 1, 2 y 3 = trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CR = cv Camino Real (Harris Moran). TO = cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla. TNI = Testigo no inoculado con *P. capsici*, suelo no esterilizado.

Figure 2. Experiment 2. Effect of the Plant age X Genotype X *Phytophthora capsici* inoculation interaction on the area under the disease progress curve of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztitlán, Hidalgo (VMH). The oomycete strains were isolated from Serrano pepper plants from the VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant 45 days after transplantation. Means from 20 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CR = Camino Real (Harris Moran) cv. TO = Tetela de Ocampo, Puebla, creole cv. TNI = control without *P. capsici* inoculation, unsterilized soil.

el cultivar Camino Real. Con excepción de este tratamiento, el patrón de respuesta entre cultivares en esa edad resultó similar. En las edades 2 y 3, el ABCPS, aunque fue más alto en los tratamientos inoculados, las diferencias con respecto al testigo sólo resultaron significativas en plantas del cultivar criollo Tetela de Ocampo inoculadas con la cepa 1, sin ASM.

La aplicación de ASM redujo el ABCPS pero no en todos los casos. En la edad 1, las plantas del cv Camino Real, inoculadas con la cepa 1 de *P. capsici* y las plantas testigo no inoculadas, tratadas con ASM, tuvieron menor ABCPS que las no tratadas con este inductor. Sin embargo las plantas

X inoculation ($P < 0.0001$) and age X resistance inducer X inoculation ($P < 0.0015$) interactions. In the first interaction, no significant differences were detected in AUDPC among the different ages, except when the plants of age 1 were inoculated with Strain 1 (Figure 2), where there was a greater AUDPC. The rest of the differences were mainly due to the inoculation with *P. capsici*, regardless of the strain, which caused greater AUDPC than in the controls (Figures 2 and 3), with the exception of Camino Real cv. plants of age 1 without inoculation, which resulted statistically equal.

When analyzing the age X resistance inducer X inoculation interaction (Figure 3), it can be seen

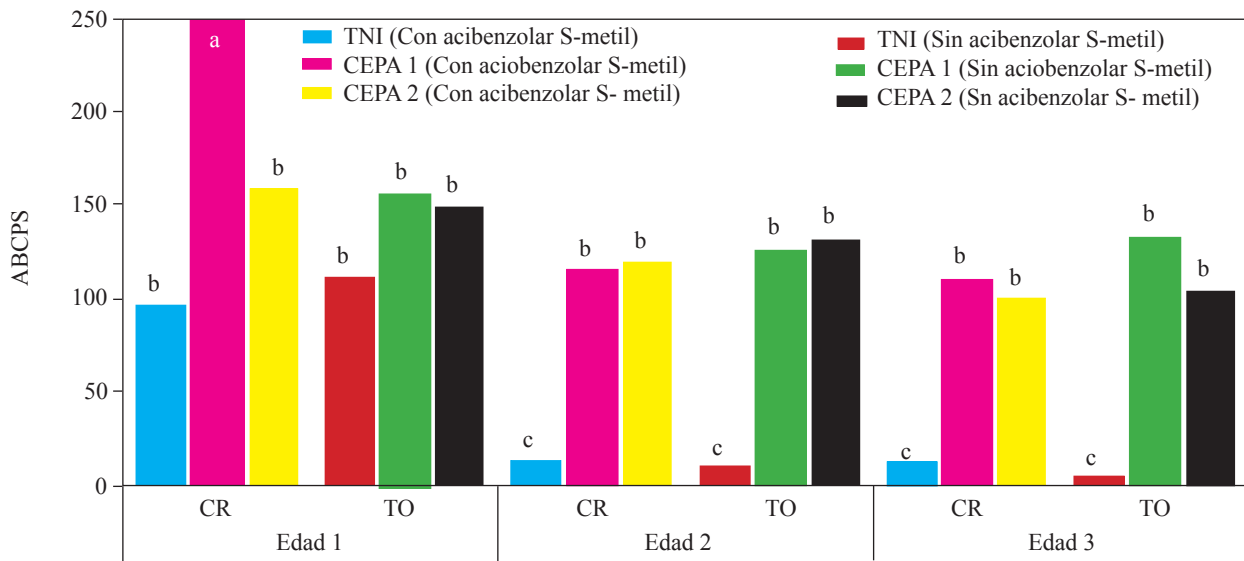


Figura 3. Experimento 2. Efecto de interacción Edad de la planta X Inductor de Resistencia X Inoculación con *Phytophthora capsici* sobre el área bajo la curva del progreso de la severidad de la marchitez del chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cultivados en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Las cepas del oomiceto fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta a los 45 días después del trasplante. Medias de veinte repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.5$). Edad 1, 2 y 3 = trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CI = con acibenzolar S-metil. SI = sin inductor de resistencia. TNI = testigo no inoculado con *P. capsici*, suelo no esterilizado.

Figure 3. Experiment 2. Effect of the Plant age X Resistance inducer X *Phytophthora capsici* inoculation interaction on the area under the disease progress curve of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). The oomycete strains were isolated from Serrano pepper plants from the VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant 45 days after transplantation. Means from 20 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CI=with acibenzolar S-methyl. SI = with no resistance inducer. TNI = control without *P. capsici* inoculation, unsterilized soil.

inoculadas con la cepa 2 no tuvieron reducción en el ABCPS por efecto del ASM y el valor de esta variable resultó significativamente más alto que el testigo no inoculado, con ASM. Las plantas de la edad 2 y 3, con y sin ASM, tuvieron un ABCPS y estadísticamente igual.

En el experimento 2, el análisis de varianza indicó efectos altamente significativos de la interacciones edad X genotipo X inoculación ($P < 0.0001$) y edad X inductor X inoculación ($P < 0.0015$). En la primera interacción no se detectaron diferencias en el ABCPS debidas a las diferentes edades, excepto cuando las plantas de la edad 1 fueron inoculadas con

that there was no significant decrease in AUDPC with the application of ASM, regardless of the age. Moreover, against expectations, plants of age 1 inoculated with Strain 1 and treated with ASM had a greater AUDPC than the control without inoculation and treated with ASM.

Formation of mycelia and sporangia of *P. capsici* from pepper roots. At the end of the experiments, there was mycelium growth in PARPH medium from plants of all ages inoculated with both strains of *P. capsici*, but the greatest number of segments where there was mycelial growth occurred in

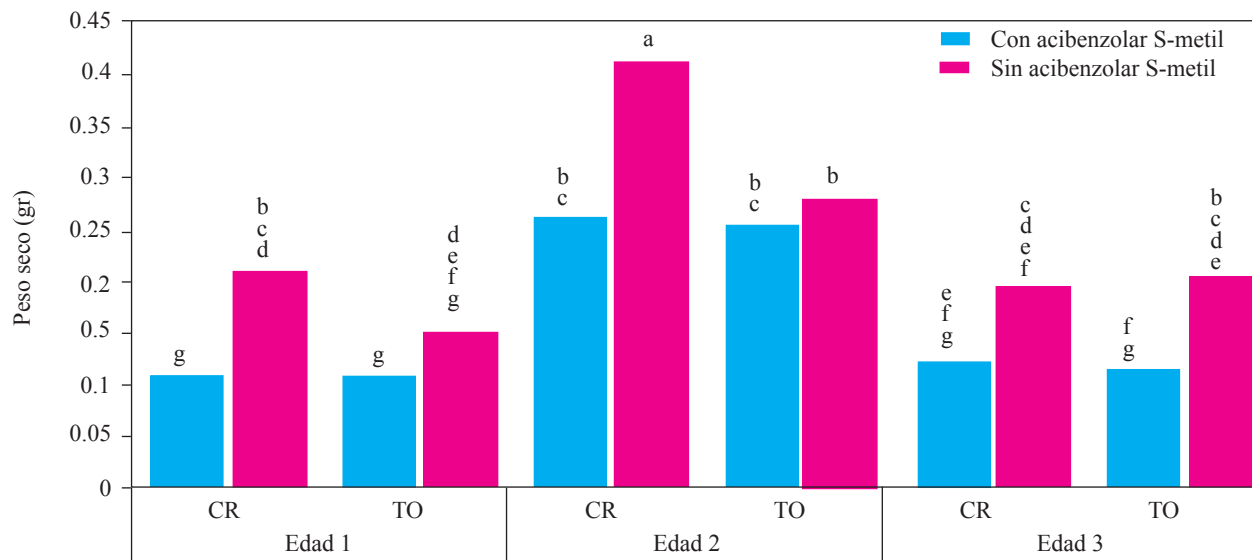


Figura 4. Experimento 1. Efecto de interacción Edad de la planta X Genotipo X Inductor de Resistencia sobre el peso seco de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Promedios de 30 repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.5$). Edad 1, 2 y 3 = trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CR = cv Camino Real (Harris Moran). TO = cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla. CI = con acibenzolar S-metil. SI = sin inductor de resistencia.

Figure 4. Experiment 1. Effect of the Plant age X Genotype X Resistance inducer interaction on the dry weight of the aerial part of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). Means from 30 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CR = Camino Real (Harris Moran) cv. TO = Tetela de Ocampo, Puebla, creole cv. CI = with acibenzolar S-methyl. SI = without resistance inducer.

la cepa 1 (Figura 2), donde se observó la ABCPS más alta. El resto de diferencias se debió principalmente a la inoculación con *P. capsici*, independientemente de la cepa, quien causó mayor ABCPS que en los testigos (Figuras 2 y 3), con excepción de las plantas no inoculadas de la edad 1, cv Camino Real, que resultaron estadísticamente iguales.

Al analizar la interacción edad X inductor X inoculación (Figura 3) se observa que no hubo reducción significativa del ABCPS con la aplicación de ASM, independientemente de la edad. Además, contra lo que se esperaba, las plantas de la edad 1 inoculadas con la Cepa 1 y tratadas con ASM tuvieron mayor ABCPS que el testigo no inoculado y tratado con ASM.

Formación de micelio y esporangios de *P. capsici* a partir raíces de chile. Al final de los experimentos

plants inoculated 45 d after seeding (age 1). The frequency of cases in ages 2 and 3 was considerably lower. ASM tended to decrease the number of cases with mycelium growth in age 1 but did not inhibit infection (data not shown). The formation of sporangia in water from root segments of pepper inoculated with *P. capsici* only occurred in age 1 plants in both experiments. These reproductive structures were not detected in plants from age 2 and 3 in any treatment.

Dry weight of the aerial part, number of leaves, and plant height. In experiment 1, the variance analysis indicated significant effects on the dry weight of the aerial part (DWAP) in the age X genotype X resistance inducer ($P=0.0137$), age X genotype X inoculum ($P=0.023$), and resistance inducer X inoculum ($P=0.0344$) interactions. The

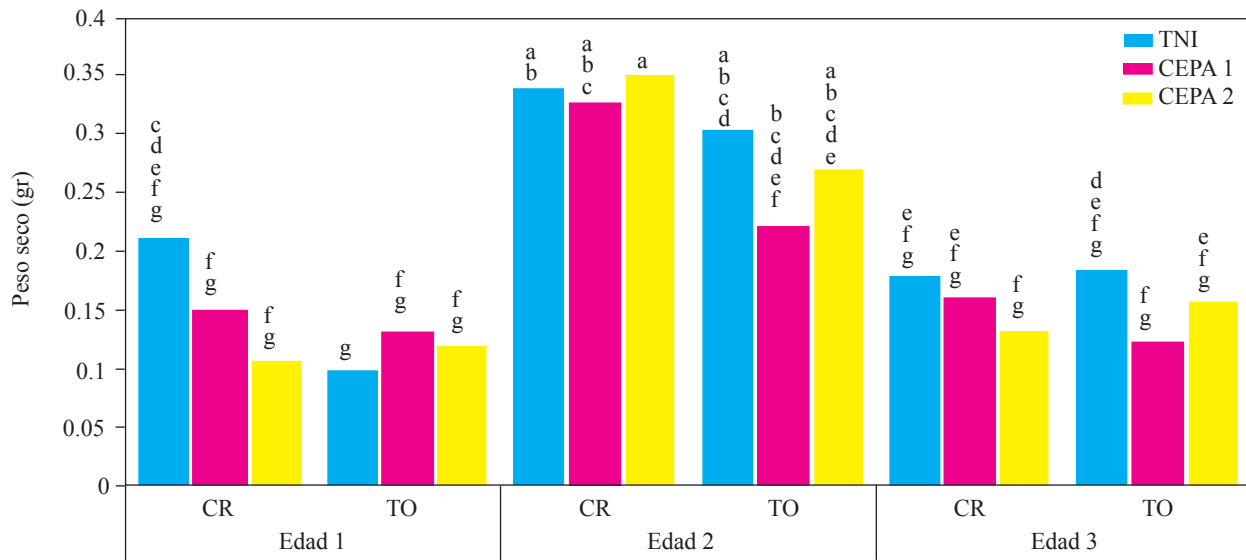


Figura 5. Experimento 1. Efecto de interacción Edad de la planta X Genotipo X Inoculación con *Phytophthora capsici* sobre el peso seco de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Las cepas del oomiceto fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta a los 45 días después del trasplante. Promedios de 20 repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.5$). Edad 1, 2 y 3 = trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CR = cv Camino Real (Harris Moran). TO = cv criollo de Tétela de Ocampo, Puebla. TNI = testigo no inoculado con *P. capsici*, suelo no esterilizado.

Figure 5. Experiment 1. Effect of the Plant age X Genotype X *Phytophthora capsici* inoculation interaction on the dry weight of the aerial part of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). The oomycete strains were isolated from Serrano pepper plants from the VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant 45 days after transplantation. Means from 20 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CR = Camino Real (Harris Moran) cv. TO = Tetela de Ocampo, Puebla, creole cv. TNI = control without *P. capsici* inoculation, unsterilized soil.

se obtuvo crecimiento micelial en medio PARPH en plantas de todas las edades inoculadas con ambas cepas de *P. capsici*, pero la mayor cantidad de segmentos donde creció micelio ocurrió en plantas inoculadas a 45 d después de la siembra (edad 1). La frecuencia de casos en las edades 2 y 3 fue considerablemente menor. El ASM tendió a reducir el número de casos con formación de micelio en la edad 1 pero no inhibió la infección (datos no mostrados). La formación de esporangios en agua, a partir de segmentos de raíz de chile inoculadas con *P. capsici*, sólo ocurrió en plantas de la edad 1 en ambos experimentos, pero en plantas de las edades 2 y 3 no se detectaron estas estructuras reproductivas en ningún tratamiento.

first interaction indicates that ASM decreased DWAP in all ages and cultivars, but only in the Camino Real cv., ages 1 and 2, and the Tetela de Ocampo cv., age 3, the differences between plants with and without ASM treatment were significant (Figure 4).

In the case of the age X genotype X inoculation interaction, the results indicate that the DWAP of the Camino Real cv., age 2, with or without *P. capsici* inoculation, was higher than any other treatment at ages 1 and 3 (Figure 5). In the Tetela de Ocampo cv. age 2, the results were statistically equal to those of the Camino Real. In plants inoculated with Strain 1, which showed a decrease in DWAP, the differences against the rest of the treatments

Peso seco de la parte aérea, número de hojas y altura de planta. En el experimento 1, el análisis de varianza indicó efectos significativos sobre el peso seco de la parte aérea (PSPA) de las interacciones edad X genotipo X inductor ($P=0.0137$), edad X genotipo X inóculo ($P=0.023$) e inductor X inóculo ($P=0.0344$). La primera interacción indica que el ASM redujo el PSPA en todas las edades y cultivares, pero sólo en las plantas del cv Camino Real, edades 1 y 2 y en el cv Tetela de Ocampo, edad 3, las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas con ASM, resultaron significativas (Figura 4).

En el caso de la interacción edad X genotipo X inoculación, los resultados indican que el PSPA del cv Camino Real, edad 2, con o sin inoculación con *P. capsici*, fue mayor que el de todos los tratamientos de las edades 1 y 3 (Figura 5). En el cv Tetela de Ocampo, edad 2, los resultados fueron estadísticamente iguales a los del cv Camino Real, pero, particularmente en las plantas inoculadas con la cepa 1, que mostró una reducción en el PSPA, las diferencias con el resto de tratamientos no resultaron significativas de acuerdo a la prueba de Tukey, no obstante el alto número de repeticiones involucradas y el hecho de que hubo reducciones de peso relativamente drásticas. Cabe también señalar que en la mayoría de los casos el PSPA de los testigos en cada edad y cultivar fue numéricamente más alto que en las plantas inoculadas con el patógeno. Los resultados de la interacción inductor de resistencia X inoculación indican que las plantas con ASM tuvieron valores más bajos que las no tratadas y que el valor más alto correspondió al testigo no inoculado y sin ASM (Figura 6). Las diferencias dentro del grupo de plantas sin ASM no resultaron significativas. El testigo no inoculado, sin ASM, tuvo un PSPA significativamente más alto que el de las plantas con ASM, con o sin inoculación con *P.*

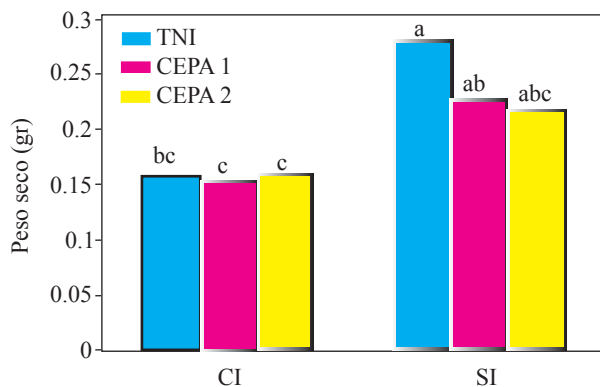


Figura 6. Experimento 1. Efecto de interacción de Inductor de Resistencia X Inoculación con *Phytophthora capsici* sobre el peso seco de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Las cepas del oomiceto fueron aisladas de plantas de chile serrano de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta a los 45 días después del trasplante. Promedios de 60 repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.5$). TNI = testigo no inoculado con *P. capsici*, suelo no esterilizado. CI = con acibenzolar S-metil. SI = sin inductor de resistencia.

Figure 6. Experiment 1. Effect of the Resistance inducer X *Phytophthora capsici* inoculation interaction on the dry weight of the aerial part of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). The oomycete strains were isolated from Serrano pepper plants from the VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant 45 days after transplantation. Means from 60 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). TNI = control without *P. capsici* inoculation, unsterilized soil. CI = with acibenzolar S-methyl. SI = without resistance inducer.

were not significant according to the Tukey test, regardless of the high number of replications involved and the fact that there were relatively drastic weight decreases. It is worth mentioning that in most cases, the DWAP of the controls in all ages and cultivars was numerically higher than in the plants inoculated with the pathogen.

The results of the resistance inducer X inoculation interaction indicate that the plants with

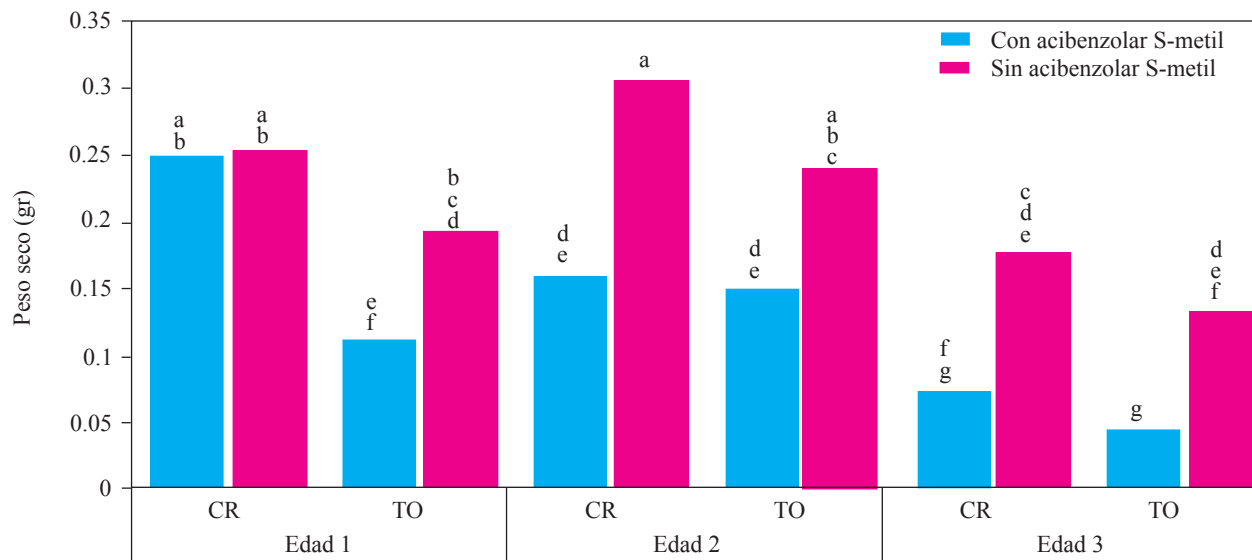


Figura 7. Experimento 2. Efecto de interacción Edad de la planta X Genotipo X Inductor de Resistencia sobre el peso seco de la parte aérea de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en suelo no esterilizado de la Vega de Metztlán Hidalgo (VMH). Promedios de 30 repeticiones. Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.5$). Edad 1, 2 y 3 = trasplante a 45, 30 y 15 días después de la siembra. CR = cv Camino Real (Harris Moran). TO=cv criollo de Tetela de Ocampo, Puebla. CI = con acibenzolar S-metil. SI = sin inductor de resistencia.

Figure 7. Experiment 2. Effect of the Plant age X Genotype X Resistance inducer interaction on the dry weight of the aerial part of Serrano pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cultivated in unsterilized soil from the Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). Means from 30 replicates. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.5$). Age 1, 2, and 3 = transplant at 45, 30, and 15 days after seeding. CR = Camino Real (Harris Moran) cv. TO = Tetela de Ocampo, Puebla, creole cv. CI = with acibenzolar S-methyl. SI = without resistance inducer.

capsici. A su vez, el PSPA de las plantas sin ASM, inoculadas con la cepa 1 de *P. capsici*, resultó mayor que el de las plantas inoculadas, tratadas con ASM.

En el experimento 2, el análisis de varianza sólo indicó efecto significativo de la interacción edad X genotipo X inductor ($P = 0.0069$) sobre el peso seco de la parte aérea (PSPA). Este resultado indica que la aplicación de ASM causó una reducción significativa en el PSPA de las plantas de todos los genotipos y edades, con excepción del cv. Camino Real, edad 1 (Figura 7). El PSPA del cv. Camino Real, edad 2, sin ASM, tuvo el valor más alto, pero fue estadísticamente igual al de las plantas del mismo cultivar, edad 1, con o sin ASM, y que las

ASM had lower DWAP values than those with no ASM and that the highest value corresponded to the control without inoculation and without ASM (Figure 6). The differences within the group of plants without ASM were not significant. The non-inoculated control with no ASM had a significantly greater DWAP than the plants with ASM, with or without *P. capsici* inoculation. Also, the DWAP of the plants with no ASM, inoculated with Strain 1 of *P. capsici* was greater than that of the inoculated plants treated with ASM.

In experiment 2, the variance analysis only showed significant effect of the age X genotype X resistance inducer interaction ($P = 0.0069$) on the dry weight of the aerial part (DWAP). This

del cultivar Tetela de Ocampo, edad 2, sin ASM. El PSPA en plantas de la edad 3, con ASM, fue significativamente más bajo en las plantas tratadas con este inductor de resistencia, independientemente del cultivar.

Los resultados del análisis de varianza del número de hojas y del área bajo la curva del progreso de la altura de planta mostraron tendencias similares a las descritas para el PSPA, con una reducción significativa en el valor de estas variables por efecto de la aplicación de ASM y una tendencia a mayor desarrollo en plantas de la edad 2, con efectos negativos de la inoculación con *P. capsici* con respecto a los testigos no inoculados (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo el ASM causó una reducción en el ABCPS de la marchitez del chile pero el efecto no fue consistente contra las dos cepas evaluadas. El factor edad de la planta por su parte determinó cambios importantes en la expresión de enfermedad.

El ASM tendió a ser más eficaz en la reducción de la severidad de la marchitez del chile en plantas de las edades 2 y 3, pero no inhibió completamente la expresión de síntomas. Esto concuerda con otros investigadores que han reportado reducción de la enfermedad con la aplicación de ASM contra *P. capsici* en chile pimiento (Matheron y Porchas, 2002) y en calabaza (Koné *et al.*, 2009). En este trabajo, el ASM se aplicó semanalmente a partir de una semana antes de inoculación, pero causó una reducción en el peso seco, número de hojas y altura de las plantas de todas las edades. Ramos (2013) también observó una disminución en el desarrollo y crecimiento de plantas de (*Physalis peruviana*) a concentraciones de ASM mayores de 10 mg/L.

result indicates that the application of ASM caused a significant decrease in the DWAP of plants of all genotypes and ages, with the exception of the Camino Real cv., age 1 (Figure 7). The DWAP of the Camino Real cv., age 2, without ASM had the highest value, but it was statistically equal to the plants of the same cultivar, age 1, with and without ASM and to the Tetela de Ocampo cultivar, age 2, without ASM. The DWAP of plants age 3, with ASM was significantly lower in the plants treated with this resistance inducer, regardless of the cultivar.

The results of the variance analysis of the number of leaves and the area under the plant height progress curve of showed similar trends than those described for the DWAP. There was a significant decrease in the value of these variables due to ASM application and a tendency to greater development in plants of age 2, with negative effects of *P. capsici* inoculation with respect to the controls with no inoculation (data not shown).

DISCUSSION

In the present work, ASM caused a decrease of the AUDPC of pepper wilt, although the effect was not consistent against both of the evaluated strains. The plant age factor determined important changes in the expression of the disease.

ASM tended to be more effective in decreasing the severity of pepper wilt in plants of ages 2 and 3, but it did not completely inhibit symptoms expression. This result agrees with other researchers who have reported a decrease in the disease with the application of ASM against *P. capsici* in bell pepper (Matheron and Porchas, 2002) and in squash (Kone *et al.*, 2009). In this work, ASM was applied weekly starting one week before inoculation, but it caused a decrease in dry weight,

Mejía *et al.* (2009) a dosis de 25 mg/L observaron también resultados similares en el cultivo del tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Por su parte, Nair *et al.* (2007) reportaron que dosis de 25 mg/L retardaron el crecimiento de plantas de Amaranto (*Amaranthus* spp.). La activación de la resistencia sistémica adquirida mediante el uso del ASM puede conducir a un costo energético adicional, produciendo plantas y productos de menor tamaño y peso (Van Wees *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2001). Sin embargo, el efecto de la aplicación de inductores puede depender del tiempo de activación de las señales, de la cepa del hongo, del inductor empleado y de la persistencia de las mismas sobre las plantas (Perazzolli *et al.*, 2008). Resulta entonces necesario realizar ensayos adicionales para optimizar el tiempo y dosis de aplicación de ASM. Por otra parte, se ha reportado que la combinación de inductores de resistencia sistémica inducida (RSI) con microorganismos que propician la resistencia sistémica adquirida (RSA) da como resultado una mayor coordinación entre las rutas metabólicas implicadas (Abo-Elyousr *et al.*, 2009), aunque se ha reportado que la activación de una ruta inhibe la otra. Este tipo de combinaciones no ha sido evaluado en Chile, por lo que sería recomendable probar la acción conjunta de inductores de RSI y RSA, así como la aplicación subsecuente de fungicidas.

Factores asociados a los cambios bioquímicos y fisiológicos en diferentes edades de las plántulas evaluadas pudieron determinar variaciones en la susceptibilidad a la enfermedad (Kim *et al.*, 1989; Gevens *et al.*, 2006; Juvany *et al.*, 2013). Para efectos prácticos, el uso de plántulas de 30 días de edad, con una dosis optimizada de ASM podría coadyuvar a una menor daño por *P. capsici*, particularmente si se toma en cuenta que los niveles naturales de infección en el suelo usado en este trabajo fueron considerablemente menores que los obtenidos con la inoculación de un alto número de zoosporas por planta.

number of leaves, and plant height in plants of all ages. Ramos (2013) also observed a decrease in plant development and growth in uchuva (*Physallis peruviana*) plants using ASM concentrations greater than 10 mg/L. Mejía *et al.* (2009) also observed similar results on tree tomato (*Solanum betaceum*) with doses of 25 mg/L. Also, Nair *et al.* (2007) reported that doses of 25 mg/L delayed growth in amaranth plants (*Amaranthus* spp.). The activation of systemic acquired resistance through the use of ASM can lead to an additional energetic cost, thus producing smaller and lighter plants and fruits (Van Wees *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2001). However, the effect of applying inducers may depend on the time of activation of the signals, the fungal strain, the inducer used, and its persistence on the plants (Perazzolli *et al.*, 2008). It is then necessary to carry out further essays to optimize the time and application dose of ASM. On the other hand, there are reports about that the combination of induced systemic resistance (ISR) inducers with microorganisms that propitiate SAR results in a greater coordination between the implicated metabolic pathways (Abo-Elyousr *et al.*, 2009); although there are reports about that the activation of one pathway inhibits the other. This type of combinations has not been evaluated in pepper, making it recommendable to test the joint action of ISR and SAR inducers, as well as the subsequent application of fungicides.

Factors associated with the biochemical and physiological changes at different seedling ages could determine variations in the susceptibility to the disease (Kim *et al.*, 1989; Gevens *et al.*, 2006; Juvany *et al.*, 2013). For practical purposes, the use of 30 d old plants with an optimized dose of ASM could help to decrease the damage from *P. capsici*. This may be particularly true if natural infection levels are as low as the ones seen in the soil used in this work which were considerably lower than those

Es necesario, sin embargo, evaluar este comportamiento bajo condiciones de campo, ya que factores ambientales y de manejo bajo esas condiciones, no son fácilmente reproducibles en invernadero.

CONCLUSIONES

La aplicación de ASM redujo el ABCPS de la marchitez del chile serrano pero también causó, en la mayoría de los casos, una reducción en la acumulación de materia seca en la parte aérea de plantas de los cultivares Camino Real (Harris Moran) y criollo de Tetela de Ocampo, Puebla.

Plantas de chile de 30 d de edad después de la siembra tuvieron mayor tolerancia a la marchitez y mayor desarrollo que plantas de 45 d o de 15 d, independientemente de si fueron inoculadas con *P. capsici* a los 45 d después del trasplante a suelo.

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados, por los recursos económicos otorgados para la realización de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Abo-Elyousr KA, Hashemb M and Alib EH. 2009. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal bio-control agents and resistance inducers. *Crop Protection* 28:295-301.
- Ando K, Hammar S, and Grumet R. 2009. Age-related resistance of diverse cucurbit fruit to infection by *Phytophthora capsici*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:176-182.
- Biles C, Wall M, Waugh M and Palmer H. 1993. Relationship of *Phytophthora* fruit rot to fruit maturation and cuticle thickness of New Mexican-type peppers. *Phytopathology* 83:607-611.
- Buzi A, Chilosi G, De Sillo D and Magro P. 2004. Induction of resistance in melon to *Dydimella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal Phytopathology* 152: 34-42.

obtained with the inoculation of a high number of zoospores per plant. It is necessary, however, to evaluate this behavior under field conditions, since environmental and management factors under those conditions are not easily reproduced in the greenhouse.

CONCLUSIONS

The application of ASM decreased the AUDPC of Serrano pepper blight but it also caused, in most cases, a decrease in the accumulation of dry matter in the aerial part of the plants of the Camino Real (Harris Moran) and the creole from Tetela de Ocampo, Puebla cultivars.

Thirty day old pepper plants had greater tolerance to wilt and greater development than did 45 d and 15 d old plants, regardless of inoculation of *P. capsici*, 45 d after transplanting.

Acknowledgements

To the Colegio de Postgraduados for the economic funding granted to carry out this research.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Carvajal ACE. 2013. Respuestas de defensa inducidas por acibenzolar-s-metil (ASM) en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*). Tesis de Maestría. Bogotá, Colombia. 84p.
- Develey-Riviere MP y Galiana E. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: A multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist* 175:405-416.
- Eikemo H, Stensvand A and Tronsmo AM. 2003. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 87:345-350.
- Gevens AJ, Ando K, Lamour K, Grumet R and Hausbeck MK. 2006. Development of a detached cucumber fruit assay to

- screen for resistance and effect of fruit age on susceptibility to infection by *Phytophthora capsici*. Plant Disease 90:1276–1282.
- Granke LL, Quesada-Ocampo L and Hausbeck MK. 2012. Advances in Research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in The United States. Plant Disease 95:1588-1600.
- Guevara I y Rodríguez-Gálvez E. 2006. Inductores químicos de resistencia en la supresión de la marchitez del algodonero causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en sistema hidropónico. Universalía 11: 2-8.
- Juvany M, Müller M and Munné-Bosch S. 2013. Plant age-related changes in cytokinins, leaf growth and pigment accumulation in juvenile mastic trees. Environmental and Experimental Botany 87:10-18.
- Kannwischer ME and Mitchell DJ. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. Phytopathology 68: 1760-1765.
- Kim YJ, Hwang BK and Park KW. 1989. Expression of age related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. Plant Disease 73:745–747.
- Koné D, Csinos AS, Jackson KL and Ji P. 2009. Evaluation of systemic acquired resistance inducers for control of *Phytophthora capsici* on squash. Crop Protection 28:533-538.
- Malolepsza U. 2006. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and O-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. Crop Protection 25:956-962.
- Matheron ME and Porchas M. 2002. Suppression of *Phytophthora* root and crown rot on pepper plant treated with acibenzolar-S-methyl. Plant Disease 86: 292-297.
- Mejía D, Rodas E, Patiño L y González J. 2009. Efecto del acibenzolar-S-metil sobre el desarrollo de virosis causada por potyvirus en tomate de árbol. Agronomía Colombiana 27:87-93.
- Morán-Bañuelos SH, Aguilar-Rincón VH, Corona-Torres T and Zavaleta-Mejía E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla. Revista Fitotecnia Mexicana 33: 21-26.
- Nair CB, Anith KN and Sreekumar J. 2007. Mitigation of growth retardation effect of plant defense activator, acibenzolar-S-methyl, in *Amaranthus* plants by plant growth-promoting rhizobacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 1183-1187.
- Perazzolli M, Dagostin S, Ferrar A, Elad I and Pertot I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. Biological Control 47:228-234.
- Radhakrishnan N, Alphonse AJ and Balasubramanian R. 2011. Effect of Acibenzolar-S-methyl (ASM) pre-treatment in inducing resistance against *Pythium aphanidermatum* infection in *Curcuma longa*. Crop Protection 30:24-32.
- Rico-Guerrero L, Medina-Ramos S, Muñoz-Sánchez CI, Guevara-Olvera L, Guevara-González RG, Guerrero-Aguilar BZ, Torres-Pacheco I, Rodríguez-Guerra R and González-Chavira MM. 2004. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de Fitopatología 22:1-6.
- Romero AM, Kousik CS and Ritchie DF. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. Plant Disease 85:189-194.
- Ramos, IM. 2013. Inducción de genes de defensa por acibenzolar-s-metil y su efecto en el control del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en Uchuva (*Physalis peruviana*). Tesis de Maestría 6-92p.
- Shaner G and Finney RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.
- Steel RGD and Torrie JH. 1980. Principles and Procedures of Statistics, Second Edition: McGraw-Hill. New York, USA.
- Van Wees SCM, De Swart EAM, Van-Pelt JA, Van-Loon LC and Pieterse CMJ. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proceeding Natural Academic. Science 97: 8711-8716.
- Whalen MC. 2005. Host defense in a developmental context. Molecular Plant Pathology 6:347–360.

# Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México

## Distribution and Frequency of Organisms Associated to Disease “Black Leg” of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Guerrero, México

Santo Ángel Ortega-Acosta, Javier Hernández-Morales\*, José Sergio Sandoval-Islas, Victoria Ayala-Escobar, Lauro Soto-Rojas. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Programa de Fitopatología, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México CP 59510. Antonino Alejo-Jaimes; CEIGUA/ INIFAP. Iguala, Guerrero. Carretera Iguala-Tuxpan, km 2.5. CP 40000. \*Correspondencia: hjavier@colpos.mx.

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Junio 29, 2015

Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Sandoval-Islas JS, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L y Alejo-Jaimes A. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 173-194.

**Resumen.** Se estudió la distribución y frecuencia de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica en Guerrero durante el 2011, se evaluaron 12 parcelas comerciales. La identificación se hizo con base en características culturales y claves taxonómicas. La caracterización molecular se efectuó amplificando la región intergenética transcripcional (ITS) del rDNA. Los organismos aislados fueron *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum truncatum*. La mayor frecuencia (72.4 %) se obtuvo con *P. parasitica* distribuido en 10 de 12 sitios, seguido por *F. oxysporum* de amplia distribución pero de baja frecuencia (10.6%), *M. phaseolina* se aisló de cuatro sitios con frecuencia de 10.9 %. *F. incarnatum*,

**Abstract.** The distribution and frequency of organisms associated with the “black leg” of roselle was studied in 2011 in Guerrero, where 12 commercial plots were evaluated. The identification was based on cultural characteristics and taxonomic keys. Molecular characterization was performed by amplifying the internal transcribed spacer region (ITS) of the rDNA. The isolated organisms were *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis longicolla*, *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum truncatum*. *P. parasitica* was the most frequent specie (72.4 %), distributed in 10 of the 12 sites, followed by *F. oxysporum* widely distributed but with low frequency (10.6 %), *M. phaseolina* was isolated from four sites with frequency 10.9 %. *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *G. cingulata* and *C. truncatum* showed low frequency (0.4 to 2.4 %) and distribution. Molecular analysis corroborated the identification of organisms. In pathogenicity tests, *P. parasitica*, *M. phaseolina* and *F. incarnatum* were pathogenic. This is the first report in Mexico for *M. phaseolina* and *F. incarnatum* as pathogen of roselle.

*F. solani*, *P. longicolla*, *G. cingulata* y *C. truncatum* presentaron baja frecuencia y distribución (0.4 a 2.4 %). Los análisis moleculares corroboraron la identificación de los organismos. En pruebas de patogenicidad, *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum* fueron patógenos. Este es el primer reporte en México para *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium incarnatum* como patógenos de la jamaica.

**Palabras clave:** pudrición de tallo y raíz, oomiceto, complejo fungoso, *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*.

En México en 2010 se cultivaron alrededor de 19, 000 ha de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), Guerrero fue el principal productor con más del 70 % (SIAP, 2010); la principal zona productora se ubica en los municipios de Ayutla y Tecoaapa. En esta región, la enfermedad “pata prieta” que se caracteriza por presentar necrosis basal, marchitez generalizada, amarillamiento de hojas y muerte de la planta, constituye una de las principales limitantes fitosanitarias para la producción de esta especie. En estudios realizados en esta zona se concluyó que *Phytophthora parasitica* es el agente causal de esta enfermedad (Hernández y Romero, 1990). Sin embargo, en otros países se han reportado diversos organismos como causantes de pudrición de tallo y raíz en el cultivo de jamaica, entre los que destacan; *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani* y *F. equiseti* (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Horst, 2008; Hassan *et al.*, 2014). En estos municipios el cultivo se distribuye en rangos de altitudes que van desde los 100 msnm hasta alturas superiores a los 700 msnm, por lo que se consideró realizar el presente trabajo de investigación, mediante un muestro estratificado (Ceja-Torres *et*

**Key words:** root and stem rot, oomycete, fungus complex, *Phytophthora parasitica*, *Macrophomina phaseolina*.

Around 19,000 ha of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) were planted in Mexico in the year 2010, and the state of Guerrero was the main producer, with over 70 % (SIAP, 2010); the main region of production is located in the municipalities of Ayutla and Tecoaapa. In this region, the disease known as “black leg,” the main characteristics of which are basal necrosis, general wilting, leaves acquiring a yellow color, and death of the plant, constitutes one of the main plant health limitations for the production of this species. Studies carried out in this region concluded that *Phytophthora parasitica* is the agent that causes this disease (Hernández and Romero, 1990). However, there have been reports in other countries of diverse organisms as the causing stem and root rot on roselle crops, the most outstanding ones being *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. Solani*, and *F. equiseti* (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Horst, 2008; Hassan *et al.*, 2014). In these municipal areas, the crop is distributed in ranges of heights that go from 100 masl to over 700 masl, therefore this research work was considered to be carried out using stratified sampling (Ceja-Torres *et al.*, 2000). Based on the above, the aim of this study was to determine the distribution and frequency of the organisms related to the “black leg” disease on roselle in Ayutla and Tecoaapa, Guerrero.

## MATERIALS AND METHODS

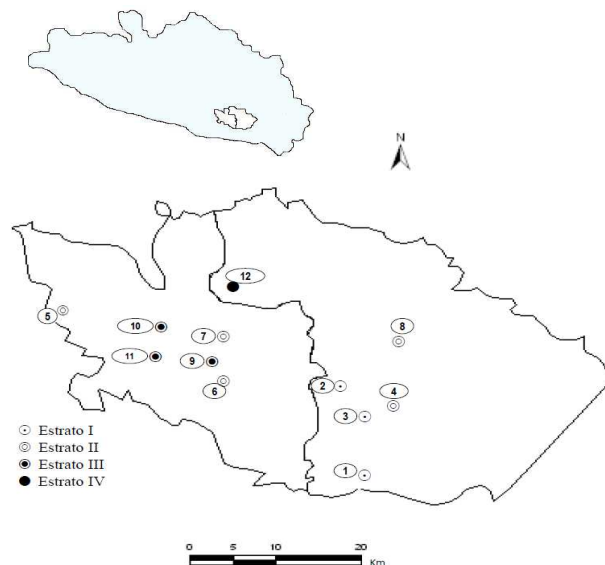
**Area of Study and Sampling.** The area of study was established in the municipalities of

*al.*, 2000). Con base en lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar la distribución y frecuencia de los organismos asociados a la enfermedad “pata prieta” de la jamaica en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Zona de estudio y muestreo.** Se estableció el área de estudio en los municipios de Ayutla y Tecoaapa (Figura 1), en el ciclo de producción primavera-verano de 2011. En base a los registros de la estación más cercana (estación: 12012), los municipios registraron temperatura y precipitación promedio anual de 27.7 °C y 1,519.9 mm (SMN, 2012). Para la selección de sitios se utilizó un muestreo estratificado (Ceja-Torres *et al.*, 2000), se consideró la variación que presenta esta zona con respecto a la altitud (msnm). Cuatro estratos quedaron definidos de la siguiente manera: estrato I) 100 a 300, estrato II) 301 a 500, estrato III) 501 a 700 y estrato IV)

Ayutla and Tecoaapa (Figure 1), in the spring-summer production cycle of 2011. Based on records from the nearest station (station 12012), the municipalities recorded an average annual temperature and rainfall of 27.7 °C and 1,519.9 mm (SMN, 2012). For the selection of sites, stratified sampling was used (Ceja-Torres *et al.*, 2000), and the variation presented by the area with regard to altitude (masl) was considered. Four strata were defined as follows: stratum I) 100 to 300, stratum II) 301 to 500, stratum III) 501 to 700, and stratum IV) >701 (Table 1). Twelve producing locations were selected and in each one a sampling site was selected. The altitude and geographic position (latitude and longitude) of each site was determined using a GPS (Garmin Etrex®) (Table 1; Figure 1). In each site selected, four samplings were carried out, directed at plants with “black leg” symptoms in the months of September, October, November, and December. Five plants were taken in each sampling, labeled for their identification, and taken to the laboratory for processing. In each



**Figura 1.** Sitios de muestreo en los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Gro. México. Ciclo de producción primavera-verano de 2011.

**Figure 1.** Sampling sites in the municipal areas of Ayutla and Tecoaapa, Gro. Mexico. Spring-summer 2011 production cycle.



>701 (Cuadro 1). Se seleccionaron 12 localidades productoras y en cada una de ellas se seleccionó un sitio de muestreo. La altitud y posición geográfica (latitud y longitud) de cada sitio se determinó mediante un geoposicionador global (GPS, Garmin Etrex®) (Cuadro 1; Figura 1). En cada sitio seleccionado, se realizaron cuatro muestreos dirigidos a plantas con síntomas de “pata prieta” en los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre. Se colectaron cinco plantas en cada muestreo, las plantas fueron etiquetadas para su identificación y trasladadas a laboratorio para ser procesadas. En cada sitio se determinaron las características físicas y químicas de suelo en el laboratorio de Física de Suelos del Colegio de Postgraduados. La textura se determinó por el método del hidrómetro de Bouyoucos, el pH (relación 1:2 en H<sub>2</sub>O) y la materia orgánica mediante el método de Walkley y Black (1934).

**Distribución y frecuencia de organismos.** Fragmentos de tejido de plantas enfermas de aproximadamente 0.5 cm se desinfectaron y sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min, posteriormente se enjuagaron tres

site, the physical and chemical characteristics were determined in the Soil Physics Lab of the Colegio de Postgraduados. Texture was determined using the Bouyoucos hydrometer method, and pH (ratio 1:2 in H<sub>2</sub>O) and organic matter, using Walkley and Black’s method (1934).

**Distribution and Frequency of Organisms.** Fragments of tissue from diseased plants of approximately 0.5 cm were disinfected in a sodium hypochlorite solution at 1.5 % for 2 min. Later, they were rinsed three times with sterile distilled water, dried with sterilized paper towels, transferred to PDA culture medium, and incubated at 24±2 °C under controlled conditions for a week; the growth of each organism was then quantified. From the data obtained for each isolated organism for each sampling site, a distribution map was created. A means difference test (Tukey, p=0.05) was performed of the frequencies obtained from each species of microorganism (SAS Institute, 1988).

**Cultural and Morphological Characterization.** The mycelial growths were transferred and purified using the monosporic culture and hyphal

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica de sitios de muestro en Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.

**Table 1.** Geographic ubication of samples sites in Ayutla and Teconapa, Guerrero, Mexico.

| Estrato | No | Comunidad            | Municipio | Altitud (msnm) | N             | O             |
|---------|----|----------------------|-----------|----------------|---------------|---------------|
| I       | 1  | Tlachimala           | Ayutla    | 103            | 16° 48' 42.6" | 99° 06' 15.6" |
| I       | 2  | Tutepec              | Ayutla    | 261            | 16° 55' 64.1" | 99° 08' 20.0" |
| I       | 3  | Pozolapa             | Ayutla    | 279            | 16° 53' 56.7" | 99° 05' 96.3" |
| II      | 4  | Tepango              | Ayutla    | 365            | 16° 54' 09.6" | 99° 04' 56.5" |
| II      | 5  | Pochotillo           | Tecoanapa | 388            | 17° 01' 42.9" | 99° 25' 78.9" |
| II      | 6  | Parota Seca          | Tecoanapa | 425            | 16° 56' 19.2" | 99° 14' 98.5" |
| II      | 7  | Tecoanapa            | Tecoanapa | 427            | 16° 59' 56.4" | 99° 15' 17.4" |
| II      | 8  | San José la Hacienda | Ayutla    | 460            | 16° 59' 00.3" | 99° 03' 94.5" |
| III     | 9  | Las Parotillas       | Tecoanapa | 637            | 16° 57' 39.2' | 99° 15' 64.2" |
| III     | 10 | Xalpatláhuac         | Tecoanapa | 659            | 17° 00' 14.1" | 99° 18' 94.6" |
| III     | 11 | Las Animas           | Tecoanapa | 667            | 16° 57' 98.6" | 99° 19' 28.3" |
| IV      | 12 | Los Tepetates        | Ayutla    | 722            | 17° 03' 32.8" | 99° 14' 69.1" |

veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril, se transfirieron a medio de cultivo PDA y se incubaron a  $24\pm 2$  °C en condiciones controladas durante una semana, se cuantificó el desarrollo de cada organismo. A partir de los datos obtenidos para cada organismo aislado por sitio de muestreo, se generó un mapa de distribución. Se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey,  $p=0.05$ ) de las frecuencias obtenidas de cada especie de microorganismo (SAS Institute, 1988).

**Caracterización cultural y morfológica.** Los crecimientos miceliales se transfirieron y purificaron utilizando la técnica de cultivos monospóricos y punta de hifa en medio agua-agar al 2 %. En la identificación preliminar, las colonias con características culturales a *Phytophthora* se transfirieron en medio de cultivo V8-agar por catorce días, y para inducir esporulación se retransfirieron discos de un centímetro de diámetro en cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril. Los aislamientos restantes se transfirieron en medio de cultivo PDA. En todos los casos, los organismos se incubaron nuevamente a  $24\pm 2$  °C. La identificación morfológica se efectuó con base en las claves taxonómicas de Holliday y Punithalingam (1970), Booth (1971), Mordue (1971), Sutton (1980), Hobbs et al. (1985), Hanlin (1990), Sutton (1992), Erwin y Ribeiro (1996), Leslie y Summerell (2006), Barnett y Hunter (2006), Gallegly y Hong (2008) y Damm et al. (2009).

**Caracterización molecular.** Del micelio de las colonias de los diferentes aislados de una semana de edad en medio PDA, se realizó la extracción de DNA con el método de CTAB (Murray y Thompson, 1980) con algunas modificaciones (uso de buffer STE1x y adición de PVP40 al 4 % al buffer de extracción). El micelio de cada especie

tip techniques in a water-agar medium at 2 %. In the preliminary identification, the colonies with cultural characteristics to *Phytophthora* were transferred on V8-agar culture medium for fourteen days, and in order to induce sporulation, disks, with a centimeter in diameter were retransferred in Petri dishes containing 25 mL of sterile distilled water. The remaining isolations were transferred on PDA culture medium. In all cases, the organisms were incubated once more at  $24\pm 2$  °C. The morphological isolation was carried out based on the taxonomical keys by Holliday and Punithalingam (1970), Booth (1971), Mordue (1971), Sutton (1980), Hobbs et al. (1985), Hanlin (1990), Sutton (1992), Erwin and Ribeiro (1996), Leslie and Summerell (2006), Barnett and Hunter (2006), Gallegly and Hong (2008), and Damm et al. (2009).

**Molecular Characterization.** DNA was extracted from the mycelia of the colonies of the different week-old isolations on PDA medium using the CTAB method (Murray and Thompson, 1980) with some modifications (use of STE1x buffer and addition of PVP40 at 4 % to the extraction buffer). The mycelium of each species was macerated with 1 mL de STE1x buffer (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.3 %). The samples were centrifuged at 14,000 rpm (revolutions per minute) for 8 min. The supernatant was decanted and 800  $\mu$ L of extraction de buffer were added (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3 %, PVP40 4 %,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.3 %). It was incubated for 40 min at 65 °C, and later, 700  $\mu$ L of chloroform/isoamylalcohol were added (24:1); it was mixed and centrifuged for 8 min at 14,000 rpm. The supernatant was transferred to a new tube containing 800  $\mu$ L of absolute ethanol. The DNA was precipitated for an hour at -20 °C, and then centrifuged for 8 min at 13,000 rpm.

se maceró con 1 mL de buffer STE1x (Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 50 mM pH8, NaCl 100mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3 %). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 8 min. El sobrenadante se decantó y se adicionaron 800  $\mu$ L de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.5 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 3 %, PVP40 4 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3 %). Se incubó durante 40 min a 65°C, posteriormente, se adicionaron 700  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó por 8 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 800  $\mu$ L de etanol absoluto. El DNA se precipitó por una hora a -20 °C. Posteriormente se centrifugó por 8 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó y el precipitado se secó a 37 °C por 20 min para resuspender el DNA obtenido en 100  $\mu$ L de agua ultrapura estéril. Para amplificar las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1-ITS2) y la región intermedia 5,8S del rDNA de todos los organismos aislados, con excepción de *Fusarium* spp., se utilizaron los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). Mientras que para las especies de *Fusarium* se emplearon los iniciadores ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), para amplificar además los dominios D1/D2 del gen 28S (O'Donnell, 1993). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 $\mu$ L, que contenían 2.5 de buffer 10X, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L de cada iniciador 10 pmol/ $\mu$ L y 0.2  $\mu$ L de Taq-DNA polymerase 5U/ $\mu$ L (Invitrogen®, USA). Las reacciones se realizaron en un termociclador Biometra, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg (segundos), alineamiento a 55 °C por 45 seg, y extensión a 72 °C por 45 seg; una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al

The supernatant was decanted and the precipitate was dried at 37 °C for 20 min to resuspend the DNA obtained in 100  $\mu$ L of sterile ultrapure water. To amplify the internal transcribed spacer regions (ITS1-ITS2) and the intermediate region 5,8S of the rDNA of all the isolated organisms, except for *Fusarium* spp., the initiators ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) were used. Meanwhile, for the species of *Fusarium*, the initiators ITS5 and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') were used, and to also amplify the dominions D1/D2 of the gene 28S (O'Donnell, 1993). The reactions took place in a final volume of 25 $\mu$ L that contained 2.5 of 10X buffer, 1  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> at 50mM, 0.5  $\mu$ L of the mixture of dNTPs 10 mM, 2  $\mu$ L of each initiator 10 pmol/ $\mu$ L and 0.2  $\mu$ L of Taq-DNA polymerase 5U/ $\mu$ L (Invitrogen®, USA). The reactions took place in a Biometra thermocycler, with the following program: initial denaturalization at 95 °C for 3 min, 35 denaturalization cycles at 95 °C for 30 sec (seconds), alignment at 55 °C for 45 sec and extension at 72 °C for 45 sec; a final extension of 72 °C for 7 min. The products of PCR were viewed by electrophoresis in agarose gel at 2 %. Once the presence of only one stripe was observed, the amplified DNA was sent to the company MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) to be sequenced.

A consensus sequences of each species was obtained by alignment (forward and reverse) using the software DNA Baser® ver. 4.16, and they were compared and aligned with those available in the database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Bank, U.S.A. using BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000) and they were deposited in the Gene Bank.

**Pathogenicity Tests.** In October of 2011, each isolated pathogen was inoculated in three-month

2 %. Una vez constatada la presencia de una sola banda, el DNA amplificado se envió con la compañía MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), para su secuenciación.

Una secuencia consenso de cada especie fue obtenida por alineamiento (forward y reverse) con el software DNA Baser® ver. 4.16, se compararon y alinearon con las disponibles en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), EE.UU. utilizando BLASTN 2.2.26 (Zhang *et al.*, 2000) y se depositaron en el GenBank.

**Pruebas de patogenicidad.** En octubre de 2011, cada patógeno aislado se inoculó en plantas de jamaica de tres meses de edad, el material vegetal utilizado, se multiplicó por semilla botánica “criolla” de Guerrero, sembradas en macetas con suelo estéril y cultivadas en cámara de ambiente controlado con temperatura de 28 °C durante el día y 18 °C en la noche, con periodos de luz/oscuridad de 12 h. El inóculo de *Phytophthora parasitica* se incrementó en medio V8-agar durante 14 días, posteriormente, para inducir la liberación de zoosporas, discos de 1cm de diámetro fueron transferidos a cajas Petri con 25 mL de agua destilada estéril sometidos a 5 °C por 5 min, y después a temperatura ambiente (24-27 °C) por 10-15 min; mientras que para el incremento de inóculo de los otros organismos aislados, solo se utilizaron cajas Petri con PDA. Así, para *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Colletotrichum truncatum* el desarrollo fue por 14 días, y 30 días para *Phomopsis longicolla* y *Glomerella cingulata*. La concentración de inóculo se estimó con una cámara de Neubauer. Para *P. parasitica* fue de  $2 \times 10^3$  zoosporas mL<sup>-1</sup>. Suspensiones conidiales de *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *P. longicolla*, y *C. truncatum* se inocularon a concentraciones de  $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>. La inoculación de *Macro-*

*roselle* plants; the plant material used was multiplied by “criolla” Guerrero botanical seeds, planted in pots with sterile soil and cultivated in a controlled environment chamber with a temperature of 28 °C during the day and 18 °C by night, with periods of light/darkness of 12 h. The *Phytophthora parasitica* inoculum increased on V8-agar medium for 14 days, and after this time, in order to induce the release of zoospores, discs with a diameter of 1cm were transferred into Petri dishes with 25 mL of sterile distilled water subjected to 5 °C for 5 min, and then to room temperature (24-27 °C) for 10-15 min; whereas for the increase in inoculum of the other isolated organisms, only Petri dishes with PDA were used. In this way, for *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, and *Colletotrichum truncatum* growth was for 14 days, and 30 days for *Phomopsis longicolla* and *Glomerella cingulata*. The concentration of inoculum was estimated using a Neubauer chamber. For *P. parasitica* it was  $2 \times 10^3$  zoospores mL<sup>-1</sup>. Conidial suspensions of *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *P. longicolla*, and *C. truncatum* were inoculated at concentrations of  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>. The inoculation of *Macrophomina phaseolina* was carried out with microsclerotia suspensions. In all cases, 10 mL of the suspension were inoculated per plant. For *G. cingulata*, ten PDA discs (1 cm diameter) were used, placed at the base of the stem of each plant. Five plants for each organism species (treatment) were inoculated and a control treatment with no inoculation was added.

A second test was carried out in the open cast, in the INIFAP- Campo Experimental Iguala, Guerrero in February of 2012, with average annual temperatures and rainfalls of 26.7 °C and 965.4 mm respectively (SMN, 2012). For the increase of the inoculum, we once again used PDA and V8-agar medium. Five three-month old plants were

*phomina phaseolina* se realizó con suspensiones de microsclerocios. En todos los casos se inocularon 10 mL de la suspensión por planta. Para *G. cingulata* se utilizaron diez discos de PDA (1 cm diámetro), colocados en la base del tallo de cada planta. Cinco plantas por cada especie de organismo (tratamiento) fueron inoculadas y se adicionó un tratamiento testigo sin inocular.

Una segunda prueba se realizó en condiciones a cielo abierto, en el INIFAP-Campo Experimental Iguala, Guerrero en febrero de 2012, con temperaturas y precipitación promedio anual de 26.7 °C y 965.4 mm respectivamente (SMN, 2012). Para el incremento de inóculo nuevamente se utilizó medio PDA y V8-agar. Se inocularon cinco plantas de tres meses de edad por cada especie de hongo u oomiceto (tratamiento) mediante la inserción en el tallo de un palillo esterilizado impregnado con micelio del microorganismo, más un testigo sin la aplicación de inóculo. Las plantas en estudio quedaron a cielo abierto después de ser inoculadas. Cuando se manifestaron síntomas inducidos por los patógenos inoculados, éstos fueron reaislados con la técnica descrita.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Distribución y frecuencia de organismos.** De las plantas colectadas y procesadas, se identificaron cinco géneros de hongos y un oomiceto. *Phytophthora parasitica* (oomiceto) se detectó en 10 sitios con frecuencias que variaron de 85 a 92.2 % (promedio de 72.4 %); *Macrophomina phaseolina* fue aislado en cuatro sitios y en dos de ellos, que fueron Tlachimala y Pozolapa, con altas frecuencias de 66.7 y 56.3 % respectivamente y con promedio de 10.6 %; *Fusarium oxysporum* se distribuyó en 11 sitios con frecuencias de aislamientos bajas (3.6 a 18.8 %) y el promedio fue de 10.6 %. Los hongos

inoculados para cada especie de fungi or oomicete (tratamiento) by inserting a sterilized toothpick impregnated with mycelium of the microorganism into the stem, plus a control without the inoculum. The plants under study remained opencast after being inoculated. When the symptoms induced by the inoculated pathogens presented themselves, these pathogens were reisolated using the technique described.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Distribution and Frequency of Organisms.

From the plants collected and processed, five genres of fungi and one oomycete were identified. *Phytophthora parasitica* (oomycete) was found in 10 sites, with frequencies that varied between 85 and 92.2 % (average of 72.4 %); *Macrophomina phaseolina* was isolated in four sites and in two of them, which were Tlachimala and Pozolapa, had high frequencies of 66.7 and 56.3 % respectively, and with an average of 10.6 %; *Fusarium oxysporum* was distributed in 11 sites with low isolation frequencies (3.6 to 18.8 %), and the average was 10.6%. The fungi *Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium solani*, *Colletotricum truncatum*, and *Glomerella cingulata*, with low frequencies (average of 0.4 to 2.4 %) and distribution (Figure 2, Table 2).

Table 2 shows that the frequency of *Phytophthora parasitica* was significantly higher ( $p=0.05$ ); the other organisms showed no significant differences between groups, yet in terms of numbers, the above was followed by *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*.

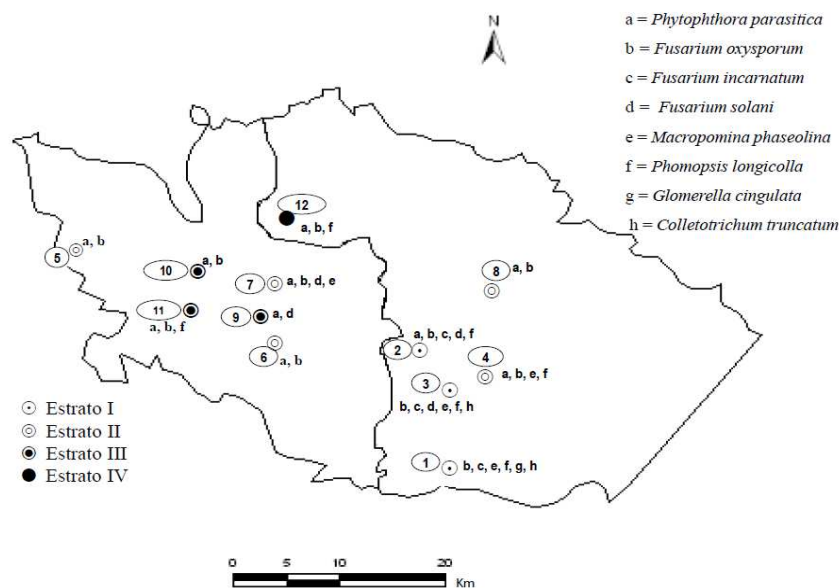
The diseased plants in which *Phytophthora parasitica* was most frequently isolated displayed generalized wilting, a yellow color, flabby leaves, necrosis in the base of the stem, which often

*Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum* y *Glomerella cingulata* de baja frecuencia (promedio de 0.4 a 2.4 %) y distribución (Figura 2, Cuadro 2).

En el Cuadro 2 se observa que la frecuencia de *Phytophthora parasitica* fue significativamente mayor ( $p=0.05$ ), los otros organismos no mostraron diferencias significativas entre grupos, sin embargo numéricamente le siguen *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*.

Las plantas enfermas en donde se aisló con mayor frecuencia a *Phytophthora parasitica* exhibieron marchitez generalizada, amarillamiento, flacidez de hojas, necrosis en la parte basal del tallo, la cual en ocasiones se extendió hacia la parte aérea, abarcando parte de las ramas (Figura 3a y b). También en menor grado fueron observados síntomas de necrosis más agrietamiento en la base del tallo con producción de exudados, lo cual en ocasiones

extended up to the aerial section, reaching parts of the branches (Figure 3a and b). Also, yet in a lesser degree, there were symptoms of necrosis observed along with cracking at the base of the stem with the production of exudates, which occasionally caused the flattening and death of the plant; these symptoms correspond to those reported by Hernández and Romero (1990), and Erwin and Ribeiro (1996). However, in diseased plants from Tlachimala and Pozolapa, where *P. parasitica* was not isolated, similar symptoms were found; in these places, necrosis was limited to the base of the plant's stem; plants were frequently found with detached epidermis and constriction in the area of progress of the disease (Figure 3d). Plants displayed generalized wilting, a yellow color, flabby leaves (Figure 3c), and death of the plant. In these sites *Macrophomina phaseolina* was frequently isolated (Table 2). Locally, both symptomatologies are known as roselle "black leg".



**Figura 2.** Distribución de organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica durante el ciclo primavera-verano 2011, en Ayutla y Tecoanapa, Guerrero.

**Figure 2.** Distribution of organisms related to “black leg” of roselle during the spring-summer 2011 cycle in Ayutla and Tecoanapa, Guerrero.

**Cuadro 2.** Frecuencia de organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta” en 12 localidades de los municipios de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México. En el ciclo de cultivo primavera-verano de 2011.

**Table 2.** Frequency of isolated organisms in roselle plants with “black leg” symptoms in 12 localities of Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, México. Crop cycle Spring-Summer 2011.

| Estrato | No | Localidad               | Frecuencia de aislamiento (%) |      |     |                  |                  |     |     |     |
|---------|----|-------------------------|-------------------------------|------|-----|------------------|------------------|-----|-----|-----|
|         |    |                         | Pp <sup>¶</sup>               | Fox  | Fso | Fin <sup>¶</sup> | Map <sup>¶</sup> | Pho | Col | Glo |
| I       | 1  | Tlachimala              | 0                             | 10   | 0   | 11.7             | 66.7             | 3.3 | 3.3 | 5   |
| I       | 2  | Tutepec                 | 89.3                          | 3.6  | 1.8 | 1.8              | 0                | 3.6 | 0   | 0   |
| I       | 3  | Pozolapa                | 0                             | 18.8 | 3.8 | 15               | 56.3             | 3.8 | 2.5 | 0   |
| II      | 4  | Tepango                 | 87.5                          | 6.3  | 0   | 0                | 4.2              | 2.1 | 0   | 0   |
| II      | 5  | Pochotillo              | 87.5                          | 12.5 | 0   | 0                | 0                | 0   | 0   | 0   |
| II      | 6  | Parota seca             | 85                            | 15   | 0   | 0                | 0                | 0   | 0   | 0   |
| II      | 7  | Tecoaapa                | 90                            | 5    | 1.3 | 0                | 3.8              | 0   | 0   | 0   |
| II      | 8  | San José la Hacienda    | 90.6                          | 9.4  | 0   | 0                | 0                | 0   | 0   | 0   |
| III     | 9  | Las Parotillas          | 92.2                          | 0    | 5.9 | 0                | 0                | 2   | 0   | 0   |
| III     | 10 | Xalpatláhuac            | 85                            | 15   | 0   | 0                | 0                | 0   | 0   | 0   |
| III     | 11 | Las Animas              | 76.8                          | 19.6 | 0   | 0                | 0                | 3.6 | 0   | 0   |
| IV      | 12 | Los Tepetates           | 85                            | 12.5 | 0   | 0                | 0                | 2.5 | 0   | 0   |
|         |    | Medias <sup>©</sup> (%) | 72.4*                         | 10.6 | 1.1 | 2.4              | 10.9             | 1.7 | 0.5 | 0.4 |

<sup>¶</sup>Pp= *Phytophthora parasitica*, Fox=*Fusarium oxysporum*, Fso=*Fusarium solani*, Fin=*Fusarium incarnatum*, Map=*Macrophomina phaseolina*, Pho=*Phomopsis longicolla*, Col=*Colletotrichum truncatum*, Glo=*Glomerella cingulata*.

<sup>¶</sup>Pp, Fin, Map = Patogénicos.

<sup>©</sup>Medias con asterisco (\*), son estadísticamente diferentes (p=0.05).

provocó el acame y muerte de la planta, éstos síntomas corresponden a los ya reportados por Hernández y Romero (1990) y Erwin y Ribeiro (1996). Sin embargo, en plantas enfermas provenientes de Tlachimala y Pozolapa en donde *P. parasitica* no fue aislado, se detectaron síntomas similares, en estos lugares la necrosis se limitó a la base del tallo de la planta, frecuentemente se encontraron plantas con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance de la enfermedad (Figura 3d), las plantas presentaron marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas (Figura 3c) y muerte de la planta, en estos sitios *Macrophomina phaseolina* fue aislado con alta frecuencia (Cuadro 2). Localmente ambas patologías son conocidas como “pata prieta” de la jamaica.

Este es el primer reporte de *M. phaseolina*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *C. truncatum* y *G. cingulata*, como organismos asociados a la enfermedad “pata prieta” en esta zona del estado

This is the first report on *M. phaseolina*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *P. longicolla*, *C. truncatum*, and *G. cingulata*, as organisms related to the “black leg” disease in this area of the state of Guerrero, in which we proved, based on pathogenicity tests, that not all were pathogenic.

On the other hand, the pH ranges varied from 4.7 to 6.9, organic matter content varied between 1.2 and 2.9 % and soil types were loam, sandy loam, and sandy clay loam. The organism *Phytophthora parasitica* was isolated from diseased plants in 10 sites which characteristically present soils with pH ranging from 4.7 to 5.5, whereas in two sites it was not isolated: Pozolapa and Tlachimala (Table 2) and presented a pH of 6.6 and 6.8, respectively (Table 3), sites located in stratum I. This indicates that the conditions of soils with pH close to neutral did not favor the presence of *P. parasitica*.

There is evidence of soil pH being a critical factor for the formation of sporangia in some



**Figura 3.** Síntomas de “pata prieta” causada por diferentes organismos. a) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. b) necrosis de tallo, extendiéndose hacia las ramas. c) marchitez generalizada, amarillamiento y flacidez de hojas. d) pudrición en raíces y base del tallo con desprendimiento de epidermis y constricción en la zona de avance.

**Figure 3.** Symptoms of “black leg” caused by different organisms. a) generalized wilting, yellowing, and leaf flabbiness; b) stem necrosis, extending to the branches, c) generalized wilting, yellowing, and leaf flabbiness. d) root and stem base rot with peeling of epidermis and constriction in the area of progress.

de Guerrero, en donde se comprobó con base en pruebas de patogenicidad, que no todos fueron patogénicos.

Por otra parte, los rangos de pH variaron de 4.7 a 6.9, el contenido de materia orgánica de 1.2 a 2.9 % y los tipos de suelo fueron franco, franco arenoso y

species of *Phytophthora*. In general, a high pH is toxic for the sporangia; in this sense, Dasgupta *et al.* (2012), evaluated the behavior of *P. parasitica* in soils with a pH of 5.4, 7.0, and 8.5, and established that the pathogen presented a better growth in a pH of 5.4. Likewise, Besoain (2013), reported that



franco arcillo arenoso. El organismo *Phytophthora parasitica* fue aislado de plantas enfermas en 10 sitios caracterizadas por presentar suelos con pH de 4.7 a 5.5, mientras que en dos sitios no fue aislado, estos fueron Pozolapa y Tlachimala (Cuadro 2) y presentaron un pH de 6.6 y 6.8 respectivamente (Cuadro 3), sitios ubicados en el estrato I. Lo anterior indica que las condiciones del suelo con pH cercanos a la neutralidad no favoreció la presencia de *P. parasitica*.

Existen evidencias de que el pH del suelo es un factor crítico para la formación de esporangios en algunas especies de *Phytophthora*. En general un pH alto resulta tóxico para los esporangios; en este sentido, Dasgupta *et al.* (2012), evaluaron el comportamiento de *P. parasitica* en suelos con pH de 5.4, 7.0 y 8.5, determinaron que el patógeno presentó el mejor crecimiento en pH de 5.4. De igual forma Besoain (2013), reportó que las colonias de *Phytophthora parasitica* se desarrollan a pH entre 5.5 y 6, y su crecimiento fue afectado cuando éste era superior a 6.5. En el presente estudio *P. parasitica* fue

the colonies of *Phytophthora parasitica* grow in a pH of between 5.5 and 6, and their growth was affected when it was higher than 6.5. In this study *P. parasitica* was isolated in soils with a pH of between 4.7 and 5.5, whereas in soils with a pH between 6.6 and 6.8 this organism was not isolated; these results are similar to those reported by Dasgupta *et al.* (2012) and Besoain (2013). On the other hand, in other crops, Jha and Dubey (2000); Surinder *et al.* (2013), determined that *Macrophomina phaseolina* prefers pH ranges between 6 and 7, similar to those found in Tlachimala and Pozolapa, where this pathogen was frequently isolated. No relation was found between the content of organic matter and texture (Table 3).

**Cultural and Morphological Characterization.** In the plants processed, eight species of microorganisms were identified: 1) *Phytophthora parasitica* Dastur developed dense colonies of a cotton-like growth in the shape of rosette, coenocytic mycelia, mostly presenting spider-like growth, predominantly oval-

**Cuadro 3.** Características edáficas en parcelas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) de Ayutla y Tecoaapa, Guerrero, México.  
**Table 3.** Soil characteristics in plots of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Ayutla and Tecoaapa, Guerrero, Mexico.

| Estrato | Localidad            | Proporción (%)  |                 |       |      |         |                        |
|---------|----------------------|-----------------|-----------------|-------|------|---------|------------------------|
|         |                      | pH <sup>†</sup> | MO <sup>‡</sup> | Arena | Limo | Arcilla | Textura                |
| I       | Tlachimala           | 6.8             | 1.8             | 67    | 18   | 15      | Franco arenoso         |
| I       | Tutepec              | 5               | 1.9             | 59    | 14   | 27      | Franco arcillo arenoso |
| I       | Pozolapa             | 6.6             | 2.9             | 69    | 16   | 15      | Franco arenoso         |
| II      | Tepango              | 5.5             | 2.9             | 63    | 16   | 21      | Franco arcillo arenoso |
| II      | Pochotillo           | 5.2             | 1.3             | 51    | 32   | 17      | Franco                 |
| II      | Parota Seca          | 5               | 2.5             | 67    | 14   | 19      | Franco arenoso         |
| II      | Tecoanapa            | 4.8             | 2.6             | 51    | 24   | 25      | Franco arcillo arenoso |
| II      | San José la Hacienda | 5               | 1.6             | 65    | 20   | 15      | Franco arenoso         |
| III     | Las Parotillas       | 4.9             | 2.2             | 59    | 18   | 23      | Franco arcillo arenoso |
| III     | Xalpatláhuac         | 4.7             | 1.8             | 71    | 4    | 25      | Franco arcillo arenoso |
| III     | Las Animas           | 5.1             | 1.2             | 45    | 32   | 23      | Franco                 |
| IV      | Los Tepetates        | 4.9             | 1.2             | 39    | 42   | 19      | Franco                 |

<sup>†</sup>pH= Potencial de Hidrógeno.

<sup>‡</sup>MO=Materia orgánica (%).

aislado en suelos con pH de 4.7 a 5.5, mientras que en suelos con pH entre 6.6 y 6.8 no se aisló este organismo, resultados similares a los reportados por Dasgupta *et al.* (2012) y Besoain (2013). Por otra parte en otros cultivos Jha y Dubey (2000); Surinder *et al.* (2013), determinaron que *Macrophomina phaseolina* prefiere rangos de pH entre 6 y 7, similares a los presentes en las localidades de Tlachimala y Pozolapa donde este patógeno fue aislado en alta frecuencia. No se detectó relación con el contenido de materia orgánica y textura (Cuadro 3).

**Caracterización cultural y morfológica.** De las plantas procesadas se identificaron ocho especies de microorganismos. 1) *Phytophthora pasitica* Dastur, desarrolló colonias densas, de crecimiento algodonoso, en forma de roseta, micelio cenocítico, en su mayoría de crecimiento aracnoide, esporangios predominantemente de forma oval y con una papila prominente, en promedio midieron de 44.4 x 35.3  $\mu\text{m}$  (largo por ancho), clamidosporas intercalares y terminales (28  $\mu\text{m}$  en promedio), características que coinciden con lo descrito para esta especie por Erwin y Ribeiro (1996) y Gallegly y Hong (2008). 2) *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid., las colonias presentaron coloración gris en su fase de crecimiento y desarrollo, oscureciéndose con la edad, desarrollaron microesclerocios muy variables en tamaño (33-54  $\mu\text{m}$ ), de redondos a irregular con coloración negra, articulados y duros, micelio septado, características que coinciden para esta especie con base en lo descrito por Holliday y Punithalingam (1970), Abawi y Pastor-Corrales (1990), Kaur *et al.* (2012). 3) *Fusarium incarnatum* (Robergge) Sacc. (= *F. semitectum*), colonias inicialmente blancas, con pigmento anaranjado en el centro, posteriormente se volvieron color marrón. En medio de cultivo CLA (Carnation Leaf Agar) produjo macroconidios con septos que variaron en número de 3 a 5 (28.3-35.4  $\mu\text{m}$ ) y con

shaped sporangia, and with a prominent papilla; average measurements were 44.4 x 35.3  $\mu\text{m}$  (length x width), intercalary and terminal chlamyospores (28  $\mu\text{m}$  on average). These characteristics coincide with descriptions for this species by Erwin and Ribeiro (1996), and Gallegly and Hong (2008). 2) *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. colonies displayed a gray color in their phase of growth and development, and became darker with age; they developed microsclerotia that varied in size (33-54  $\mu\text{m}$ ), round to irregular in shape with a black color, articulate and hard, septate mycelia; these characteristics for the species coincide with descriptions by Holliday and Punithalingam (1970), Abawi and Pastor-Corrales (1990), Kaur *et al.* (2012). 3) *Fusarium incarnatum* (Robergge) Sacc. (= *F. semitectum*), initially white colonies with an orange pigment in the center, later became brown. In CLA (Carnation Leaf Agar) medium, it produced macroconidias with septa that varied in numbers from 3 to 5 (28.3-35.4  $\mu\text{m}$ ) and with a foot-shaped base cell, microconidias from 0 to 3 septa, these characteristics coincide with descriptions by Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) for this species. 4) *Fusarium oxysporum* Snyder and Hansen, pinkish-white colonies that turned violet with time, presented fusiformed conidias, generally with 3 septa measuring 23.3-49.9 x 3.1-5.2  $\mu\text{m}$ , an abundance of microconidias, without septa and cylindrical, intercalary and terminal chlamyospores; these characteristics coincide with those reported by Nelson *et al.* (1983), Leslie and Summerell (2006). 5) *Fusarium solani* Snyder and Hansen displayed cream-colored colonies, scarce mycelia, abundant sporodochia present, frequently with a greenish pigmentation in the center, macroconidias between 5 and 7 septa measuring 28.3-41.5 x 4.3-6.4  $\mu\text{m}$ , microconidias from 0 to 2 septa, conidiogenous cells in long monophialides; these characteristics coincide with

célula basal en forma de pie, microconidios de 0 a 3 septos, estas características coinciden a lo descrito por Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006) para esta especie. 4) *Fusarium oxysporum* Snyder y Hansen, colonias de color blanco-rosada, con el tiempo se tornaron violeta, presentaron macroconidios fusiformes, generalmente con 3 septos, de 23.3-49.9 x 3.1-5.2 µm, microconidios abundantes, sin septos y cilíndricos, clamidosporas intercalares y terminales, características que coinciden con las reportadas por Nelson *et al.* (1983), Leslie y Summerell (2006). 5) *Fusarium solani* Snyder y Hansen, presentó colonias de color crema, micelio escaso, esporodocios presentes en abundancia, frecuentemente con pigmentación verdosa en el centro, macroconidios de 5 a 7 septos de 28.3-41.5 x 4.3-6.4 µm, microconidios de 0 a 2 septos, células conidiogénicas en monofialides largas, características que coinciden para esta especie de acuerdo a Nelson *et al.* (1983), Leslie y Summerell (2006). 6) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. y H. Schrenk, colonias de color blanco grisáceo a oscuras, las ascas se formaron después de 3 a 4 semanas, de forma clavada a cilíndrica (45.8-62.6 x 9.2-11.6 µm) ligeramente curvadas, con ocho ascosporas por asca de forma cilíndricas (11.7-18.5 x 3.8-5.3 µm), unicelulares y hialinas, esto concuerda con las características culturales y morfológicas señaladas para esta especie por Mordue (1971). (7) *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus y W.D. Moore, colonias planas, blanco grisáceas, desarrollaron acérvulos. Las setas midieron en promedio 80-150 µm, conidióforos más de 90 µm y conidios ligeramente curvados, con promedio de 17.5-21.5 x 2.55-3.32 µm, estas características fueron consistentes para la descripción de *Colletotrichum truncatum* (Damm *et al.*, 2009). 8) *Phomopsis longicolla* Hobbs (= *Diaporthe longicolla*) (Santos *et al.*, 2011), las colonias presentaron crecimiento algodonoso de color blanco, se observaron picnidios

the description by Nelson *et al.* (1983), and Leslie and Summerell (2006). 6) *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. and H. Schrenk, grayish-white to dark colonies, with asci that formed after 3 to 4 weeks, with nailed to cylindrical shapes (45.8-62.6 x 9.2-11.6 µm) slightly curved, with eight ascospores for every cylinder-shaped ascus (11.7-18.5 x 3.8-5.3 µm), unicellular and hyaline; this coincides with the cultural and morphologic description for this species by Mordue (1971). (7) *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus and W.D. Moore, flat colonies, grayish-white, they develop acervuli. Setae measured on average 80-150 µm, conidiophores were over 90 µm and conidia, slightly curved, measuring an average of 17.5-21.5 x 2.55-3.32 µm; these characteristics were consistent with the description of *Colletotrichum truncatum* (Damm *et al.*, 2009). 8) *Phomopsis longicolla* Hobbs (= *Diaporthe longicolla*) (Santos *et al.*, 2011), the colonies presented white, cottonlike growth, long pycnidia were observed which produced alpha-conidia and beta-conidia. The alpha-conidia were hyaline, ellipsoidal, to fusiform, measuring 4.05-7.57 x 1.48-3.25 µm. Beta-conidia, scarce, hyaline, threadlike, and with a hook-shaped tip, measured 18.2-34.5 x 1.3-2.9 µm. Cultural and morphological characteristics adjust to the description of *Phomopsis longicolla* reported by Hobbs *et al.* (1985).

**Molecular Characterization.** The amplifications performed with the ITS5/ITS4 initiators amplified a fragment of approximately 900 pb for *Phytophthora parasitica*, and of approximately 600 pb for *Macrophomina phaseolina*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum*, and *Phomopsis longicolla*. With the ITS5/NL4 initiators, a fragment of approximately 1100 pb was amplified in the *Fusarium* spp isolations. The consensus sequences of nucleotides obtained when compared to those

alargados y produjeron alfa-conidios y beta-conidios. Los alfa-conidios fueron hialinos, elipsoides a fusiformes de 4.05-7.57 x 1.48-3.25  $\mu\text{m}$ . Beta-conidios, escasos, hialinos, filiformes y con punta en forma de gancho, con dimensiones de 18.2-34.5 x 1.3-2.9  $\mu\text{m}$ . Las características de cultivo y morfológicas se ajustan a la descripción de *Phomopsis longicolla* reportadas por Hobbs *et al.* (1985).

**Caracterización molecular.** Las amplificaciones realizadas con los iniciadores ITS5/ITS4 amplificaron un fragmento aproximado de 900 pb para *Phytophthora parasitica*, y de aproximadamente 600 pb para *Macrophomina phaseolina*, *Glomerella cingulata*, *Colletotricum truncatum* y *Phomopsis longicolla*. Con los iniciadores ITS5/NL4 se amplificó un fragmento aproximado de 1100 pb en los aislamientos de *Fusarium* spp. Las secuencias consenso de nucleótidos obtenidas al ser comparadas con las disponibles en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), indicaron un 99% de porcentaje de similitud (Cuadro 4). Lo que confirmó la identidad de los organismos aislados a nivel de especie. La secuencia consenso de cada microorganismo fue depositada en el GenBank (Cuadro 4).

**Pruebas de patogenicidad.** En los ensayos realizados en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto *Phytophthora parasitica* resultó ser el organismo de mayor patogenicidad, al causar la muerte del 100 % de las plantas inoculadas. Plantas inoculadas con este organismo en cámara de ambiente controlado, mostraron síntomas de la enfermedad 10 días después de inocularse (ddi) (Cuadro 5). A cielo abierto los síntomas de la enfermedad fueron observados a los 7 ddi. Resultados similares a los obtenidos por Hernández y Romero (1990) para *P. parasitica*. El hongo *Macrophomina phaseolina*, en cámara de ambiente controlado indujo síntomas

available in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), indicated a 99 % similarity (Table 4), which confirmed the identity of the isolated organisms at the species level. The consensus sequence of each microorganism was deposited in the GenBank (Table 4).

**Pathogenicity Tests.** In the tests performed in a controlled environment chamber and in the opencast, *Phytophthora parasitica* turned out to be the organism with the highest pathogenicity, causing the deaths of 100 % of the inoculated plants. The plants that were inoculated with this organism in a controlled environment chamber showed symptoms of the disease 10 days after inoculation (dai) (Table 5). Opencast, the symptoms of the disease were observed 7 dai. Similar results were obtained by Hernández and Romero (1990) for *P. parasitica*. The fungus *Macrophomina phaseolina*, in a controlled environment chamber, produced symptoms in a plant at 28 dai (Table 5), and later, at an advanced stage of the disease (34 dai) formed microsclerotia in the base of the stem; whereas opencast, it produced symptoms in two plants at 13 dai (Table 5). In the sites where *M. phaseolina* was isolated in high frequently, with 66.7 % and 56.3 % (Tlachimala and Pozolapa, respectively), were the only ones in which the presence of *Phytophthora parasitica* was not detected, therefore we considered that *M. phaseolina* caused the symptoms observed. However, in Tepango and Tecoanapa, where *M. phaseolina* was also detected, though less frequently (4.2 % and 3.8 %) respectively, *P. parasitica* was isolated more frequently (Table 2), which is why the latter was considered to be the cause of the disease. In Mexico, up until the moment in which this investigation was carried out, there were no reports on the pathogenicity of *M. phaseolina* on roselle.

**Cuadro 4.** Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA de los organismos aislados de plantas de jamaica con síntomas de “pata prieta”.

**Table 4.** Molecular characterization by alignment of sequences reported in the gene bank with the intergenic sequences (ITS) of the rDNA genes of organisms isolated roselle plants with symptoms of “black leg”.

| Identificación morfológica      | No. de depósito en el NCBI <sup>y</sup> | Secuencia más cercana en el NCBI                                                   | BLAST (%) de similitud | No. de acceso en el NCBI |
|---------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Phytophthora parasitica</i>  | KM519189                                | <i>Phytophthora parasitica</i>                                                     | 99                     | GU111682                 |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>  | KM519193                                | <i>Macrophomina phaseolina</i>                                                     | 99                     | HQ649832                 |
| <i>Fusarium incarnatum</i>      | KM519192                                | <i>Fusarium incarnatum</i>                                                         | 99                     | AY633745                 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>       | KM519188                                | <i>Fusarium oxysporum</i>                                                          | 99                     | AY188919                 |
| <i>Fusarium solani</i>          | KM519190                                | <i>Fusarium solani</i>                                                             | 99                     | KF938479                 |
| <i>Glomerella cingulata</i>     | KM519191                                | <i>Glomerella cingulata</i> ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ) <sup>z</sup> | 99                     | JN697580                 |
| <i>Colletotrichum truncatum</i> | KM519187                                | <i>Colletotrichum truncatum</i>                                                    | 99                     | KC460308                 |
| <i>Phomopsis longicolla</i>     | KM519194                                | <i>Diaporthe longicolla</i> ( <i>Phomopsis longicolla</i> ) <sup>z</sup>           | 99                     | KF577911                 |

<sup>y</sup>NCBI (National Center of Biotechnology Information).

<sup>z</sup>Anamorfo.

en una planta a los 28 ddi (Cuadro 5), posteriormente en la etapa avanzada de la enfermedad (34 ddi) formó microesclerocios en la base del tallo; mientras que a cielo abierto, indujo síntomas en

*Fusarium incarnatum* caused symptoms of the disease only in opencast tests, in two of the five inoculated plants. The symptoms were observed 15 dai (Table 5), and characteristically included

**Cuadro 5.** Pruebas de patogenicidad con organismos asociados a la “pata prieta” de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).

**Table 5.** Pathogenicity tests with organisms associated to “black leg” of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.).

| Organismo inoculado             | Plantas con síntomas |     | Días a inicio de síntomas |    | Incidencia (%) |     | Incidencia total (%) |
|---------------------------------|----------------------|-----|---------------------------|----|----------------|-----|----------------------|
|                                 | 1 <sup>o</sup>       | 2   | 1                         | 2  | 1              | 2   |                      |
| <i>Phytophthora parasitica</i>  | 5/5 <sup>†</sup>     | 5/5 | 10                        | 7  | 100            | 100 | 100                  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>       | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |
| <i>Fusarium solani</i>          | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |
| <i>Fusarium incarnatum</i>      | 0/5                  | 2/5 | -                         | 15 | -              | 40  | 20                   |
| <i>Macrophomina phaseolina</i>  | 1/5                  | 2/5 | 28                        | 13 | 20             | 40  | 30                   |
| <i>Glomerella cingulata</i>     | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |
| <i>Phomopsis longicolla</i>     | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |
| <i>Colletotrichum truncatum</i> | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |
| Testigo                         | 0/5                  | 0/5 | -                         | -  | -              | -   | -                    |

<sup>o</sup>1=Ensayo 1, realizado en cámara de ambiente controlado. 2= Ensayo 2, realizado a cielo abierto / 1=Assay 1, tested in inviromental controled chamber. 2=Assay 2, tested on opencast.

<sup>†</sup> Proporción de plantas que mostraron síntomas en cada ensayo / Proportion of plants that showed symptoms on every assay.

dos plantas a los 13 ddi (Cuadro 5). En los sitios donde se aisló *M. phaseolina* en alta frecuencia con 66.7 % y 56.3 % (Tlachimala y Pozolapa respectivamente), fueron los únicos donde no se detectó la presencia de *Phytophthora parasitica*, por lo que se consideró que *M. phaseolina* es el que causó los síntomas observados. Sin embargo, en los sitios de Tepango y Tecoaapa en donde también se detectó a *M. phaseolina* con baja frecuencia (4.2 % y 3.8 %) respectivamente, *P. parasitica* se aisló con mayor frecuencia (Cuadro 2), por lo que se considera a este último como el causante de la enfermedad. En México hasta el momento en que se desarrolló esta investigación, no se encontraron reportes de la patogenicidad de *M. phaseolina* en jamaica.

*Fusarium incarnatum* ocasionó síntomas de la enfermedad únicamente en ensayo a cielo abierto, en dos de cinco plantas inoculadas. Los síntomas se observaron a los 15 ddi (Cuadro 5), y se caracterizaron por marchitez y necrosis basal. Al aislarse a este organismo con una baja frecuencia (2.4 %) (Cuadro 2), se considera en este estudio, como patógeno secundario de la enfermedad “pata prieta” en los sitios donde se detectó.

Los resultados de las inoculaciones con *Phytophthora parasitica* indicaron que este organismo fue el de mayor patogenicidad, seguido por *Macrophomina phaseolina* y el de menor patogenicidad fue *Fusarium incarnatum* (Cuadro 5). En Egipto *M. phaseolina* y *F. incarnatum* fueron aislados de plantas con síntomas de pudrición radical y marchitez de plantas de jamaica. En inoculaciones artificiales en invernadero y a cielo abierto determinaron que *M. phaseolina* fue más patogénico que *F. incarnatum* (Hassan *et al.*, 2014), lo que coincide con lo determinado en el presente estudio.

A partir de plantas inoculadas en forma independiente con *P. parasitica*, *M. phaseolina* y *F. incarnatum*, y que indujeron síntomas se obtuvo

wilting and basal necrosis. Because this organism was isolated at a low frequency (2.4 %) (Table 2), it is considered by this study as a secondary pathogen of the “black leg” disease in the areas in which it was detected.

The results of the inoculations with *Phytophthora parasitica* indicated that this organism had the highest pathogenicity, followed by *Macrophomina phaseolina*, and the lowest pathogenicity was *Fusarium incarnatum* (Table 5). In Egypt, *M. phaseolina* and *F. incarnatum* were isolated from plants with symptoms of rooting rot and wilt of roselle. In artificial inoculations in greenhouses and in the open cast *M. phaseolina* was found to be more pathogenic than *F. incarnatum* (Hassan *et al.*, 2014), which coincides with the findings by this investigation.

From plants independently inoculated with *P. parasitica*, *M. phaseolina*, and *F. incarnatum*, and that produced symptoms, we obtained the same species that was inoculated when reisolating.

In the tests performed in a controlled environment chamber and open cast, as shown in Table 5, the other inoculated organisms and control plants did not show symptoms of the disease.

In a similar study carried out in Nigeria on roselle with stem and root rot, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium solani* were isolated. In pathogenicity tests *P. parasitica* was found to be the main cause of the disease; *R. solani* only caused the death of plantlets, and *F. solani* was not pathogenic (Adeniji, 1970).

*Phytophthora parasitica* has been reported in Guerrero by Hernández and Romero (1990) as being the cause of “black leg,” in India, it causes root and stem rotting in roselle (Kumar and Mandal, 2010), and its presence has also been reported in Africa, Indonesia, Puerto Rico, Malaysia, Philippines, Ivory Coast, Brazil, and other countries, as the cause of root rot and stem in this species (Erwin

la misma especie que fue inoculada, al realizar los reaislamientos.

En los ensayos realizados en cámara de ambiente controlado y a cielo abierto, como se observa en el Cuadro 5, los otros organismos inoculados y las plantas testigos no manifestaron síntomas de la enfermedad.

En un estudio similar realizado en Nigeria, en jamaica con pudrición de tallo y raíz, se aisló a *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*. En pruebas de patogenicidad *P. parasitica* resultó ser el principal agente causal de la enfermedad; *R. solani* solo causó muerte de plántulas y *F. solani* no fue patogénico (Adeniji, 1970).

*Phytophthora parasitica* ha sido reportado en Guerrero por Hernández y Romero (1990) como agente causal de la “pata prieta”, en la India causa la pudrición radical y de tallo en jamaica (Kumar y Mandal, 2010), también se ha informado de su presencia en África, Indonesia, Puerto Rico, Malasia, Filipina, Costa de Marfil, Brasil, entre otros países, como causante de pudrición radical y de tallo en esta especie (Erwin y Ribeiro, 1996; Drenth y Guest, 2004; Silva *et al.*, 2014).

Por otra parte, en Cuba y el Salvador, Wellman (1977) reportó que *Macrophomina phaseolina* es causante de pudrición del tallo en plantas de jamaica, recientemente en Egipto se menciona como inductor de pudrición radical y marchitez de plantas en esta misma especie (Hassan *et al.*, 2014). En Bangladés, se ha aislado de semilla de jamaica, como patógeno que afecta la germinación (Islam *et al.*, 2013). También se menciona en otras especies del género *Hibiscus*. Así, en la India causa la “pudrición del cuello” en hibisco de coral (*Hibiscus schizopetalus*) (Santhakumari, 2002).

El hongo *Fusarium incarnatum* (= *F. semitectum*) en Egipto se reporta como causante de pudrición radical y marchitez de jamaica (Hassan *et al.*, 2014). Además en otros países se tienen registros

and Ribeiro, 1996; Drenth and Guest, 2004; Silva *et al.*, 2014).

Likewise, in Cuba and El Salvador, Wellman (1977) reported that *Macrophomina phaseolina* causes stem rot in roselle plants, and recently, in Egypt, it was mentioned as inducing root rot and wilting of plants of this same species (Hassan *et al.*, 2014). In Bangladesh, it has been isolated from roselle seeds as a pathogen that affects germination (Islam *et al.*, 2013). It is also mentioned in other species of the genus *Hibiscus*. In India it causes “collar rot” in coral hibiscus (*Hibiscus schizopetalus*) (Santhakumari, 2002).

In Egypt, the fungus *Fusarium incarnatum* (= *F. semitectum*) has been reported as the cause of root rot and roselle wilting (Hassan *et al.*, 2014). Also, in other countries, there are records of it being pathogenic in other species of the genus *Hibiscus*. For example, Farr and Rossman (2015) report *F. incarnatum* in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) in Iran and Kenya, and on tulip (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) in the Island of Barbados. Leslie *et al.* (1990) indicate that *F. incarnatum* is a common pathogenic agent in the soil, distributed mostly in tropical and subtropical regions.

The fungus *Fusarium oxysporum* was not considered pathogenic, despite reports of its pathogenicity in roselle in Malaysia, Nigeria, United States, and other countries (Ooi and Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014).

Additionally, in India *Hibiscus sabdariffa* is reported as a new host for *Fusarium solani* (Padaganur *et al.*, 1988). In Egypt, Hassan *et al.* (2014) mention that *F. solani* is a pathogenic agent for roselle, and Chehri *et al.* (2014) in Malaysia isolated it from roselle plants with symptoms of root rot. However, in this study it was not pathogenic.

The genus *Colletotrichum* includes several pathogenic species of plants with economic

como patógeno de otras especies del género *Hibiscus*, por ejemplo; Farr y Rossman (2015) reportan a *F. incarnatum* en kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en Irán y Kenia, y sobre tulipán (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) en la Isla de Barbados. Leslie *et al.* (1990) indica que *F. incarnatum* es un agente patogénico común en el suelo, distribuido principalmente en regiones tropicales y subtropicales.

El hongo *Fusarium oxysporum* no fue patogénico, sin embargo existen reportes como patógeno de jamaica en Malasia, Nigeria, EUA, entre otros países (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014).

Por otra parte en la India reportan a *Hibiscus sabdariffa* como nuevo hospedante de *Fusarium solani* (Padaganur *et al.*, 1988). En Egipto Hassan *et al.* (2014) mencionan que *F. solani* es agente patogénico para la jamaica, además Chehri *et al.* (2014) en Malasia lo aisló de plantas de jamaica con síntomas de podredumbre de raíz, sin embargo en el presente estudio no fue patogénico.

El género *Colletotrichum* incluye a numerosas especies patógenas de plantas de importancia económica. Distribuido principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Cannon *et al.*, 2012). El hongo *Colletotrichum truncatum* es patógeno de jamaica en la India (Farr y Rossman, 2015) y además se ha reportado en otras especies del género *Hibiscus*, por ejemplo: *H. esculentum* en la India y Pakistán; mientras que en Malasia sobre *H. rosa-sinensis* (Farr y Rossman, 2015). *Glomerella cingulata* también se ha reportado en especies del género *Hibiscus* tales como *H. tiliaceus* como causante de antracnosis en los EUA (Farr y Rossman, 2015) y en *H. rosa-sinensis* en Argentina (Rivera *et al.*, 2000). Tanto *C. truncatum* y *G. cingulata* también han sido reportadas como especies endófitas de plantas de la familia Malvaceae, además de otras

importance distributed mainly in tropical and subtropical regions (Cannon *et al.*, 2012). The fungus *Colletotrichum truncatum* is a pathogen of roselle in India (Farr and Rossman, 2015), and it has also been reported in other species of the genus *Hibiscus*, such as *H. esculentum* in India and Pakistan or *H. rosa-sinensis* in Malaysia (Farr and Rossman, 2015). *Glomerella cingulata* has also been reported on species of the genus *Hibiscus* such as *H. tiliaceus* as the cause of anthracnose in the United States (Farr and Rossman, 2015) and on *H. rosa-sinensis* in Argentina (Rivera *et al.*, 2000). Both *C. truncatum* and *G. cingulata* have also been reported as endophytic species of the Malvaceae family, as well as other plant species (Costa *et al.*, 2012; Kumar and Kaushik, 2013). This coincides with findings from this study, in which they were not found to be pathogenic in roselle plants.

The genus *Phomopsis* is related to diseases in herbaceous plants, although it can attack bushes and some fruit trees (Agrios, 2005). *P. longicolla* cause stem blight in peanut plants (*Arachis hypogaea* L.) (Sanogo and Etarock, 2009); in soybean, it induces cankers in the stem, and it can infect pods and seeds (Lu *et al.*, 2010; Li, 2010). It has also been reported as being an endophyte in soybean and other species (Larran *et al.*, 2002; Wagenaar and Clardy, 2001; Rhoden *et al.*, 2012). No reports were found on this organism as a pathogen of roselle (Farr and Rossman, 2015), and in this study it was not found to be pathogenic.

Due to the above, the fungi *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. cingulata*, *C. truncatum*, and *P. longicolla* are considered organisms associated to roselle and of low risk for this area of study, since they were not found to be pathogenic (Table 5). The frequency of isolation was low and in general terms, they displayed a limited distribution.



especies de plantas (Costa *et al.*, 2012; Kumar y Kaushik, 2013). Lo que coincide con lo obtenido en este estudio, al no ser patogénicos en plantas de jamaica.

El género *Phomopsis* se relaciona con enfermedades de plantas herbáceas, aunque puede atacar arbustos y algunos árboles frutales (Agrios, 2005). *P. longicolla* en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) causa tizón del tallo (Sanogo y Etarock, 2009), en soya induce canchales en tallo, y es capaz de infectar vainas y semillas (Lu *et al.*, 2010; Li, 2010), también ha sido reportado como endófito en soya y otras especies (Larran *et al.*, 2002; Wagenaar y Clardy, 2001; Rhoden *et al.*, 2012), no se encontraron reportes de este organismo como patógeno de jamaica (Farr y Rossman, 2015), además en el presente estudio, este organismo no fue patogénico. Por lo anterior los hongos *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. cingulata*, *C. truncatum* y *P. longicolla* se consideran organismos asociados a la jamaica y de bajo riesgo para esta zona en estudio, debido a que no fueron patogénicos (Cuadro 5), la frecuencia de aislamiento fue baja y en general presentaron distribución limitada.

## CONCLUSIONES

Se concluye que *Phytophthora parasitica* es el organismo de mayor frecuencia y distribución en la región estudiada, por lo que se considera el principal agente causal de la enfermedad “pata prieta”. El hongo *Macrophomina phaseolina* presentó baja distribución, sin embargo fue aislado en alta frecuencia en dos sitios, por lo que es el causante de la enfermedad en tales lugares. *Fusarium incarnatum* fue patogénico, sin embargo se requiere de más estudios, debido a su baja frecuencia y distribución. Se reporta por primera vez a *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium incarnatum* como patógeno de la jamaica en México. *Fusarium oxysporum*

## CONCLUSIONS

We conclude that *Phytophthora parasitica* is the organism with the greatest frequency and distribution in the region studied, and is therefore considered the main cause of the “black leg” disease. The fungus *Macrophomina phaseolina* presented low distribution, although it was isolated with high frequency in two sites, and therefore it is the cause of the disease in these places. *Fusarium incarnatum* was pathogenic, although it requires further study, due to its low frequency and distribution. *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium incarnatum* are reported as pathogenic for roselle for the first time in Mexico. *Fusarium oxysporum* was found widely distributed, yet it presented a low frequency and it was not pathogenic. The fungi *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum*, and *Phomopsis longicolla* are considered low risk for the crop, since they are not pathogenic and their isolation frequency was low.

~~~~~ End of English version ~~~~~

se encontró ampliamente distribuido, no obstante presentó baja frecuencia y no fue patogénico. Los hongos *Fusarium solani*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum truncatum* y *Phomopsis longicolla* se consideran de bajo riesgo para el cultivo, debido a que no fueron patogénicos y su frecuencia de aislamiento fue baja.

LITERATURA CITADA

Abawi GS and Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 114 p.

- Adeniji MO. 1970. Root and stem rot of the fiber crop roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in Nigeria. *Plant Disease Reporter* 54:23-25.
- Agrios GN. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Amusa NA, Adegbite AA and Oladapo MO. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4:122-125.
- Besoain CAX. 2013. Control biológico de *Phytophthora* en tomates y pimientos desarrollados bajo invernadero. Pp: 65-68. In: Montealegre ARJ y Pérez RLM (Eds). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile*. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 147 p.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Ceja-Torres LF, Téliz OD, Osada KS y Morales-García LJ. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fito-patología* 18 (002): 79-86.
- Chehri K, Salleh B and Zakaria L. 2014. *Fusarium virguliforme*, a soybean sudden death syndrome fungus in Malaysian soil. *Australasian Plant Disease Notes* 9:128.
- Costa IPMW, Assuncao MMC, Lima TEF, Oliveira RJV and Cavalcanti MAQ. 2012. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119: 494.
- Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF and Crous PW. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45-87.
- Dasgupta B, Mohanty B and Datta P. 2012. Survival of *Phytophthora parasitica* causing foot and leaf rot of betelvine under different soil pH, moisture and temperature regimes. *SAARC Journal of Agriculture* 10 (1):29-43
- Drenth A and Guest DL. 2004. Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. *ACIAR Monograph No. 114*, 238p.
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Farr DF and Rossman AY. 2015. *Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/> (consulta, marzo 2015).
- Gallegly ME and Hong C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 158 p.
- Hanlin RT. 1990. *Illustrated genera of ascomycetes*. Vol. 1. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 263 p.
- Hassan N, Shimizu M and Hyakumachi M. 2014. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Upper Egypt. *Mycobiology* 42(1): 66-72.
- Hernández MJ y Romero CS. 1990. Identificación del agente causal de “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L.)” y pruebas de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* (67-68):50-54.
- Hobbs TW, Schmitthenner AF and Kuter GA. 1985. A new *Phomopsis* species from soybean. *Mycologia* 77, 535–44.
- Horst RK. 2008. *Westcott’s plant disease handbook*. Seventh Edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg . New York, USA. 1317 p.
- Holliday P and Punithalingam E. 1970. *Macrophomina phaseolina*. Commonwealth Mycological Institute. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 275. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Islam MS, Uzzal MSI, Mallick K and Monjil MS. 2013. Management of seed mycoflora of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) by seed washing, garlic extract and knowin. *Progressive Agriculture*. 24(1 and 2): 1-7.
- Jha AK and Dubey SC. 2000. Occurrence of collar rot of (*Abelmoschus esculentus*) in the plateau region of Bihar. *Journal of Research Birsa Agriculture University* 12 (1): 67-72.
- Kaur S, Dhillon GS, Brar SK, Vallad GE, Chand R and Chauhan VB. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38(2):136–151.
- Kumar R and Mandal RK. 2010. Effect of different fungicides on *Phytophthora parasitica* var. *sabdariffae* and *Sclerotium rolfsii* infecting mesta. *Pestology* 34:23-27.
- Kumar S and Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS ONE* 8(2):e56202.
- Larran S, Rollan C, Bruno HA, Alippi HE and Urrutia MI. 2002. Nota corta: endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigación Agraria. Producción y protección vegetales*. 17 (1):173–178.
- Leslie JF and Summerell BA 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Leslie JF, Pearson AC, Nelson EP and Tousey AT. 1990. *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343-350.
- Li S, Hartman GL and Boykin DL. 2010. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. *Plant Disease* 94(8):1035-1040.
- Lu X, Robertson EA, Byamukama ZE, and Nutter WF. 2010. Evaluating the importance of stem canker of soybean in Iowa. *Plant Disease* 94 (2):167-173.
- Mordue JEM. 1971. *Glomerella cingulata*. No. 315. In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. CAB, Kew, UK.
- Murray HG and Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*. 8:4321-4325.

- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, pp. 225–233. Edited by Reynolds DR and Taylor JW. Wallingford, UK: CAB International.
- Ooi KH and Salleh B. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. *Biotropia* 12:31-41.
- Padaganur, GM, Kachapur, MR, Naik KS and Patil NK. 1988. *Hibiscus sabdariffa* L., a new host to *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Plant Pathol Newsl* 6 (1-2):13.
- Ploetz RC, Palmateer AJ, Geiser DM and Juba JH. 2007. First report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* on roselle in the United States. *Plant Disease* 91:639.
- Rhoden SA, Garcia A, Bongiorno VA, Azevedo JL and Pamphile JA. 2012. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (08): 57-59.
- Rivera MC, Wright ER and Carballo S. 2000. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on chinese rose in Argentina. *Plant Disease* 84: 1345. (34598).
- Sanogo S and Etarock FB. 2009. First report of *Phomopsis longicolla* causing stem blight of valencia peanut in New Mexico. *Plant Disease* 93 (9):965.1-965.1.
- Santhakumari P, Kavitha K and Nisha MS. 2002. Occurrence of collar rot in coral *Hibiscus*: a new record. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 32(2):258-258.
- Santos JM, K. Vrandečić K, Čosić J, Duvnjak T and Phillips AJL. 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 27: 9-19.
- SAS Institute. 1988. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Edition. SAS Institute, Inc. Cary, N.C. USA.
- SIAP. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 (consulta, mayo 2012).
- Silva GS, Rêgo AS and Leite RR. 2014. Doenças da vinagreira no Estado do Maranhão. *Summa Phytopathologica* 40 (4): 378-380.
- SMN. 2012. Servicio meteorológico nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Periodo (1981-2010). http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=182:guerrero&catid=14:normal-es-por-estacion (consulta, enero 2012).
- Surinder K, Bahadur VC, Kaur SB and Singh GD. 2013. Adaptability of *Macrophomina phaseolina* isolates of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) to different temperature and pH. *International Journal of Life Sciences* 1 (2): 81-88.
- Sutton BC. 1980. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England 696 p.
- Sutton BC. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ, eds. *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International. pp 1–26.
- Wagenaar MM and Clardy J. 2001. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *Journal of Natural Products* 64: 1006–1009.
- Walkley A and Black IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29–38.
- Wellman LF. 1977. Dictionary of tropical American crops and their diseases. The Scarecrow Press, Inc. Metuchen, New Jersey. 666 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. New York NY. Academic Press, Inc. pp. 315-322.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.

Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México

Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico

Jorge Luis Flores-Sánchez, Gustavo Mora-Aguilera. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Edo. de México, C.P. 56230, México; **Emiliano Loeza-Kuk.** Centro de Investigación Regional Sureste, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mocochoá, Yucatán. C.P. 97454, México; **J. Isabel López-Arroyo.** Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Nuevo León. C.P. 67413; **Santiago Domínguez-Monge, Gerardo Acevedo-Sánchez.** Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Edo. de México. C.P. 56230, México; **Pedro Robles-García.** SENASICA-DGSV. Coyoacán, D.F. CP 04100. Correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Junio 29, 2015.

Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 195-210.

Resumen. El objetivo de este estudio fue estimar pérdidas productivas inducidas por el agente asociado al Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en México, mediante la evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos. En el estado de Yucatán, México, se seleccionó una huerta de limón persa de cuatro años, con árboles bajo un mismo manejo e infección, esta característica se verificó por PCR cuantitativo. El estudio se condujo bajo cuatro niveles de severidad (0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100, porcentaje de síntomas de HLB en dosel). Se evaluaron ocho variables morfológicas y organolépticas en un diseño de bloques con tratamientos apareados. Los valores de peso,

Abstract. The aim of this study was to estimate yield losses induced by the agent associated with Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) in Mexico, by evaluating morphological and organoleptic fruit variables. A four-year old Persian lime orchard in the state of Yucatán, Mexico, was selected; the trees were under same disease management and infection; this feature was verified by qPCR. The study was conducted under four severity levels (0=healthy, 1=25, 2=50, 3=75, 4=100, percentage of canopy with HLB symptoms). Eight morphological and organoleptic variables were evaluated in a restricted random block design with healthy and CLAs infected trees. The values of weight, size, skin thickness, juice volume (JV) and pH were statistically higher in fruits from healthy trees as well as in asymptomatic branches of positive trees, in comparison with symptomatic branches (Tukey, $P=0.05$). CLAs induced reduction on weight (17.3 %) and JV (18.6 %), with more damage in trees showing 100 % of canopy with HLB symptoms; the regression models were: $Y_{weight} = 217.2 - 4.2x + 0.03x^2$, $R^2 = 0.86$; $Y_{volume} = 645.4 - 11.7x + 0.09x^2$, $R^2 = 0.82$.

tamaño, grosor de cáscara, volumen de jugo (VJ) y pH fueron estadísticamente mayores en frutos de árboles sanos y en ramas asintomáticas de árboles positivos, en comparación con los frutos de ramas sintomáticas (Tukey, $P=0.05$). CLas indujo reducción en peso (17.3 %) y VJ (18.6%), con mayor daño en árboles con 100 % de síntomas de HLB en dosel; los modelos de regresión fueron: $Y_{\text{peso}} = 217.2 - 4.2x + 0.03x^2$, $R^2=0.86$; $Y_{\text{VJ}} = 645.4 - 11.7x + 0.09x^2$, $R^2=0.82$. La reducción en peso implicó una pérdida en producción de 2.4 toneladas/ha. El efecto perjudicial se asoció al nivel de severidad y concentración de CLas, ya que se detectó que la intensidad de los síntomas de HLB están en función de la concentración bacteriana mediante el modelo $Y_{\text{bacteria}} = 1.17 + 0.77x - 0.0067x^2$, $R^2=0.91$. El presente documento constituye el primer estudio cuantitativo del efecto de CLas en la producción del limón persa.

Palabras clave: Severidad, Huanglongbing, concentración bacteriana, cítricos agrios.

En México, el Huanglongbing (HLB) de los cítricos se asocia a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas); la primera detección en el país de esta enfermedad devastadora de la citricultura a nivel mundial, se realizó en julio de 2009, en Tizimín, Yucatán (Trujillo, 2010). Este patógeno se transmite y dispersa por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert y Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2013). En febrero 2015, 23 de los 25 estados que integran la citricultura nacional confirmaron la presencia de CLas en árboles y principalmente en vectores, con lo cual se definen dos escenarios epidémicos: 1) área de mayor intensidad y prevalencia en huertos comerciales: Región del Pacífico y 2) área de menor intensidad y prevalencia en traspatio: Península de Yucatán y Golfo de México (Mora-Aguilera *et al.*, 2013).

The weight reduction implicate a 2.4 tons/ha yield loss. The detrimental effect was associated with severity level and CLas concentration, we found that the intensity of the symptoms of HLB is a function of the bacterial concentration in the model $Y_{\text{bacteria}} = 1.174 + 0.8x - 0.0067x^2$, $R^2 = 0.91$. This is the first quantitative study of CLas effects on production of Persian lime.

Key words: Severity, Huanglongbing, bacterial concentration, sour citrus.

In México, Huanglongbing (HLB) has been associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas); the first report in the country of this devastating disease to citrus industries worldwide was made during July 2009, in Tizimin, Yucatan (Trujillo, 2010). This pathogen is transmitted and spreads by *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert and Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2013). For February 2015, 23 of 25 citrus-producing states of the Mexican citriculture confirmed the presence of CLas in trees and mainly in vectors, defining two epidemic scenarios: 1) area of greatest intensity and prevalence in commercial orchards: Region of the Pacific, and 2) area of less intensity and prevalence in backyard: Yucatan Peninsula and Gulf of Mexico (Mora-Aguilera *et al.*, 2013).

Unlike the effects of HLB in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) in Brazil, and Florida, U.S.A. (Bassanezi *et al.*, 2011; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006), in the country the highest severity of physiological and histological symptoms caused by HLB has been found in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) and Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). The symptoms in leaves of citrus trees include chlorotic spots, angular stains, corky and thickening veins, mottle and diffuse chlorosis, as

A diferencia de los efectos de HLB en naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de Brasil, y Florida, U.S.A. (Bassanezi *et al.*, 2011; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006), en el país la mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos causados por HLB se encuentran en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Los síntomas en hojas de cítricos agrios incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta el amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación. La maduración irregular sólo se ha observado en limón mexicano, la cual inicia con un color amarillento en la parte basal y eventualmente termina en la caída de frutos (Robles-González *et al.*, 2013). Histológicamente existe un incremento de almidón en el mesófilo de limón mexicano y persa. En naranja dulce se concentra en el parénquima de empalizada. En todos los casos se presenta hiperplasia, lo que ocasiona un colapso de floema (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

La información sobre el impacto destructivo del HLB con sustento cuantitativo y epidemiológico es escasa; los estudios existentes estimaron el impacto con base en el número de plantas erradicadas y costos por control del vector en cítricos dulces (Brlansky *et al.*, 2009). En Brasil, las pérdidas en producción por efecto del HLB variaron entre 41 a 100 % en naranja dulce cv. Valencia (Bassanezi *et al.*, 2009). Bassanezi *et al.* (2011) determinaron la relación de la producción con el efecto de la enfermedad e indicaron una tendencia perjudicial; además encontraron que la magnitud del impacto productivo también depende del manejo agronómico y edad de los árboles. En México, se estimaron pérdidas en producción en toda la cadena productiva de limón mexicano y limón persa (17.6 %) y naranja dulce (57.6 %) mediante métodos multivariados y

well as the generalized yellowing of the leaf and defoliation. Irregular ripening has only appeared in the Mexican lime, beginning with a yellow color in the base, and eventually falling of fruits (Robles-González *et al.*, 2013). Histologically, there is an increase in starch in the mesophyll of Mexican and Persian limes. In sweet orange, it concentrates in the palisade parenchyma. In all cases, there is hyperplasia, which causes a collapse in the phloem (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Information about HLB's destructive impact with quantitative and epidemiological support is scarce; available studies estimated the impact based on the number of eradicated plants and costs of the vector control in sweet citrus plants (Brlansky *et al.*, 2009). In Brazil, losses in production due to the effect of HLB were in the range of 41 and 100 % in sweet orange cv. Valencia (Bassanezi *et al.*, 2009). Bassanezi *et al.* (2011) determined the relationship of production with the effect of the disease and indicated a damaging trend; nonetheless, they also found that the magnitude of the production impact depends on the agronomic management and tree age. In Mexico, there were estimated losses in production throughout the production chain of Mexican lime and Persian lime (17.6 %) and sweet orange (57.6 %) using multivariate methods and comparative epidemiology at 3 and 5 years since the beginning of the disease (Salcedo *et al.*, 2010). Given the current dispersion of CLAs in the citriculture of the Mexican Pacific and the Yucatan Peninsula and its prevalence in sour citrus for which mostly the effects of this pathogen was unknown (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), there is an urgent need to know the impact on production of this citrus group. Therefore, the objective of this study was to determine the CLAs detrimental effect on the production of Persian lime, *C. latifolia*, by analyzing morphological and organoleptic variables on fruits.

epidemiología comparativa a 3 y 5 años (Salcedo *et al.*, 2010).

Ante la dispersión existente de CLas en la citricultura del Pacífico mexicano y Península de Yucatán, y debido a la prevalencia en cítricos agrios, para los cuales se desconocía en su mayoría los efectos de este patógeno (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), surge la necesidad imperiosa de conocer el impacto en la producción de este grupo de cítricos. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto detrimental de CLas en la producción de limón persa, *C. latifolia*, mediante el análisis de variables morfológicas y organolépticas en frutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Se delimitó un bloque de 0.5 ha en un huerto comercial, compuesto por 30 ha de limón persa de cuatro años de edad ubicado en Tizimín, Yucatán y con presencia de la enfermedad desde 2010. El manejo agronómico incluyó riego por goteo, fertilización, poda y control químico de *D. citri*.

Evaluación de síntomas y severidad. La evaluación de severidad se realizó en 388 árboles con una escala aritmética. Dicha escala consideró las clases: 0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100 %. El porcentaje de severidad se calculó con la división del dosel del árbol en cuatro secciones de 25 %. La severidad total (Sevt) por árbol fue la suma del porcentaje de cada sección (s) Donde $s = 1-4$.

Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR cuantitativo. El tejido vegetal se colectó en Marzo de 2011, época favorable para la multiplicación de la bacteria y expresión de síntomas. Cada muestra consistió de ocho hojas,

MATERIALS AND METHODS

Place of study. A 0.5 ha block was delimited in a commercial orchard made up of 30 ha of four-year old Persian lime trees located in Tizimin, Yucatan, attacked by the disease since 2010. Agronomic management included drip irrigation, fertilization, trimming, and chemical control of *D. citri*.

Evaluation of symptoms and severity. The evaluation of severity was carried out in 388 trees using an arithmetic scale, which considered the types 0=healthy, 1=25, 2=50, 3=75 and 4=100 % of canopy with HLB symptoms. The percentage of severity was calculated by dividing the canopy of the tree in four sections of 25% each. The total severity (Sevt) by tree was the sum of the percentage of each section (s) Where $s = 1-4$.

Diagnostic and quantification of the concentration of CLas. The plant tissue was collected in March 2011, a favorable time for the multiplication of the bacteria and expression of symptoms. Each sample consisted of eight leaves; samples were separated by symptomatic and asymptomatic sections in diseased trees. Likewise, healthy trees were sampled as controls. Molecular analysis consisted in isolating DNA with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen ®) from 100 mg of plant tissue following the manufacturer's protocol. Detection and quantification was carried out in a Biorad® CFX96 thermocycler with a TaqMan® probe and specific primers for CLas that amplify a portion of the gene 16S rDNA, an positive internal control based on cytochrome-oxidase (COX) was included primers for the as reaction (DGSV-CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006).

For the quantification of the number of genomic copies of CLas in the samples, an external

se separaron muestras por secciones sintomáticas y asintomáticas en árboles enfermos. Del mismo modo se muestrearon árboles sanos como testigos. El análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) para 100 mg de tejido vegetal con el protocolo del fabricante. La detección y cuantificación se realizó en un termociclador Biorad® CFX96, con sonda TaqMan® e iniciadores específicos para CLas que amplifican una porción del gen 16S rDNA, así como una sonda e iniciadores para la enzima citocromo-oxidasa (COX) como control interno de la reacción. (DGSV-CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006).

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido PGEM-T® Promega®). El plásmido se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; estas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas (y) donde $y = (-6.221) * \text{LN}(\text{Ct}) + 27.409$.

La determinación de la relación de la severidad de síntomas con la concentración bacteriana, se realizó mediante el ajuste de un modelo cuadrático.

Evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos. Los frutos se colectaron, etiquetaron y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su evaluación entre el segundo y quinto día después de la cosecha. Las variables morfológicas medidas fueron peso por fruto (gr), diámetro ecuatorial (DE), diámetro polar (DP), grosor de cáscara (GC) (mm) y volumen de jugo (VJ) (mL) de 10 frutos por tratamiento. Las variables organolépticas se midieron en el jugo extraído de los frutos, principalmente se determinó la concentración de grados Brix con un refractómetro digital (Palette®), pH con un potenciómetro (HACH®), y acidez titulable

calibration curve was generated. A fragment of the gene 16S rDNA was used, cloned in a plasmid PGEM-T® Promega®). The plasmid was purified and quantified using uv-spectrophotometry (Nanodrop 1000) and serial dilutions were carried out. The reaction were performed in triplicate per concentration and a logarithmic regression was used to estimate the CLas concentration (y), in which $y = (-6.221) * \text{LN}(\text{Ct}) + 27.409$.

Relationship of the severity of symptoms with the bacterial concentration was determined in a quadratic model fitted.

Evaluation of morphologic and organoleptic variables in fruits. The fruits were harvested, labeled and kept in refrigeration at 4 °C until their evaluation was performed 2 and 5 days after harvest. The morphological variables measured were weight per fruit (gr); equatorial diameter (ED), polar diameter (PD), skin thickness (ST) (mm); and volume of juice (VJ) (mL) of 10 fruits per treatment. The organoleptic variables were measured in the juice extracted from the fruit: we determined mainly concentration of Brix degrees using a digital refractometer (Palette®), pH with a potentiometer (HACH®), and titratable acidity through the phenolphthalein method (Helrich, 1990).

Statistical analysis. The experiment consisted of a design in blocks with paired treatments: healthy trees (T1) adjacent to infected trees, in which branches were differentiated in asymptomatic (T2) and symptomatic (T3). Thirty-two trees were chosen, distributed in six blocks in incomplete sub repetitions with four, six, and eight trees. The blocks were selected in a directed way to disease outbreaks. This method is similar to that used by Cristóbal *et al.* (2006) to reduce the variability of the data by effects of intensity and infection periods, soil fertility, and agronomic management of the

con el método de fenolftaleína (Helrich, 1990).

Análisis estadístico. El experimento consistió en un diseño de bloques con tratamientos apareados, árboles sanos (T1) adyacentes a árboles enfermos, de los cuales se diferenciaron ramas asintomáticas (T2) y sintomáticas (T3). Se seleccionaron 32 árboles distribuidos en seis bloques en sub-repeticiones incompletas con cuatro, seis y ocho árboles. Los bloques se seleccionaron en forma dirigida a focos de enfermedad. Esta metodología es análoga a la empleada por Cristóbal *et al.* (2006) para reducir la variabilidad de los datos por efectos de intensidad y periodos de infección, fertilidad de suelo y manejo agronómico del huerto. Para la evaluación de las variables morfológicas y organolépticas, en cada árbol se colectaron 10 frutos en T1, T2 y T3. Las medias de cada variable por árbol se organizaron por tratamientos, severidad y bloque para un ANOVA y comparación de medias con Tukey ($P=0.05$). Los análisis se realizaron con SAS V9.0. Adicionalmente, se realizó un análisis correlativo de pérdidas con 10 árboles por cada clase de severidad (50 árboles), para así incrementar la variabilidad del efecto de producción en función del daño. Previo al análisis correlativo, se detectaron posibles observaciones fuera de tendencia y se excluyeron. Los valores de cada variable evaluada y el porcentaje de severidad de cada árbol se ajustaron independientemente a distintos modelos correlativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de los síntomas de HLB en limón persa. Los frutos de limón persa que se evaluaron en este estudio carecieron de los síntomas característicamente atribuibles a HLB como los que se indicaron previamente para cítricos dulces (Bassanezi *et al.*, 2009) y para limón mexicano, como

orchard. For the evaluation of morphological and organoleptic variables, in each tree 10 fruits were collected in T1, T2, and T3. The averages of each variable per tree were organized by treatments, severity, and block for an ANOVA and comparison of averages using Tukey test ($P=0.05$). Analyses were carried out using SAS V9.0. In addition, a correlative analysis was made of losses with 10 trees for each severity level (50 trees) for to increase the variability of the effect of production depending on the damage. Before the correlative analysis, outliers were detected and excluded. The values for each evaluated variable and the percentage of severity for each tree were independently adjusted at different correlative models.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of the symptoms of HLB in Persian lime. The Persian lime fruits evaluated in this study showed no symptoms typically attributed to HLB, such as the ones indicated earlier for sweet citrus fruits (Bassanezi *et al.*, 2009) and for Mexican limes, like irregular ripening and fruit fall (Robles-González *et al.*, 2013); the above was recorded even in fruits from trees with a severity of 100% HLB severity. In this study, HLB symptoms were found in Persian lime leaves, without a distribution pattern in the canopies of studied trees. The symptoms observed (Figure 1) begin with diffuse mottled (A) that become larger until they are clearly defined and formed internerval angular spots are formed (B), which become distorted in chlorotic spots that invade the whole leaf (C). Plants with severe infections present thickening and corky of the central rib (D) with a coriaceous appearance; finally, a semi-intense and generalized yellowing can be seen in the leaf (E) without reaching the abscission, as is the case in Mexican lime and

maduración irregular y caída de frutos (Robles-González *et al.*, 2013), lo anterior se registró aún en frutos provenientes de árboles con severidad del 100%.

En el presente estudio los síntomas de HLB se detectaron en hojas de limón persa, sin un patrón de distribución en el dosel de los árboles. Los síntomas que se observaron (Figura 1) iniciaron con mo-

whose symptoms occur faster (Robles-González *et al.*, 2013). In sweet oranges these symptoms are less intense, furthermore, the generalized yellowing of the leaf occurs infrequently and no defoliation of the same is observed (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). These authors also indicated this tendency in histological symptoms, suggesting that in Mexico, sour citrus fruits present symptoms at a greater speed, intensity, and generalization in



Figura 1. Síntomas de HLB en limón persa (*C. latifolia*) confirmados como positivos por PCR cuantitativo. (A) Moteado difuso; (B) Manchas angulares; (C) Manchas angulares y puntos cloróticos; (D) Engrosamiento y acorchamiento de nervadura; (E) Amarillamiento generalizado de la lámina foliar; (F) Frutos de rama sintomática con amarillamiento asociado a HLB; (G) Fruto de rama sana. Tizimín, Yucatán, 2011.

Figure 1. Symptoms of HLB in Persian lime (*C. latifolia*) confirmed as positive by quantitative PCR. (A) Diffuse mottled; (B) Angular spots; (C) Angular and chlorotic spots; (D) Rib thickening and cork appearance; (E) Generalized yellowing of the leaf; (F) Fruits from symptomatic branch with yellowing associated with HLB; (G) Fruit from healthy branch. Tizimín, Yucatan, 2011.

teados difusos (A) que aumentaron de tamaño hasta definirse claramente y formar manchas angulares internervales (B), las cuales se distorsionan en puntos cloróticos que invaden la lámina foliar (C). En plantas con infección severa se observa engrosamiento y acorchamiento de la nervadura central (D) con un aspecto coriáceo; finalmente se apreció un amarillamiento medianamente intenso y generalizado en la lámina foliar (E) sin llegar a la abscisión como sucede en limón mexicano y cuyos síntomas ocurren con mayor velocidad (Robles-González *et al.*, 2013). En naranja dulce, estos síntomas son menos intensos ya que el amarillamiento generalizado de la lámina foliar ocurre en poca frecuencia y no se observa defoliación de las mismas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Estos autores también indicaron esta tendencia en síntomas histológicos, lo que sugiere que en México los cítricos agrios exhiben síntomas con mayor velocidad, intensidad y generalización en el dosel que los que se registraron en otros países (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2009).

Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLAs en limón persa. Se confirmó por PCR en tiempo real la condición sanitaria de los árboles seleccionados como sanos y enfermos. Los árboles infectados mostraron diferentes concentraciones de CLAs, de manera preliminar se detectó que la intensidad de los síntomas inducidos está en función de la concentración bacteriana. La asociación de la concentración de CLAs y la severidad se demostró con el ajuste a un modelo de correlación cuadrático $y = 1.1736 + 0.774x - 0.0057x^2$, $R^2 = 0.91$ (Figura 2).

La relación de la concentración bacteriana con la severidad de HLB sugiere que la expresión de síntomas posee una relación directa con el incremento de inóculo de la bacteria en la planta, lo cual explica que a mayor severidad exista mayor efecto negativo en la producción de limón persa (Figura 4).

the canopy than those registered in other countries (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2009).

Diagnostic and quantification of the concentration of CLAs in Persian lime. The sanitary condition of the selected trees was confirmed by PCR in real time as either healthy or infected. The latter displayed different concentrations of CLAs; the intensity of the symptoms induced were preliminarily found to depend on the bacterial concentration. The relation between the concentration of CLAs and the severity was shown to fit a quadratic correlation model $y = 1.1736 + 0.774x - 0.0057x^2$, $R^2 = 0.91$ (Figure 2).

The relation between bacterial concentration and the severity of HLB suggests that there is a direct relationship between expression of symptoms and

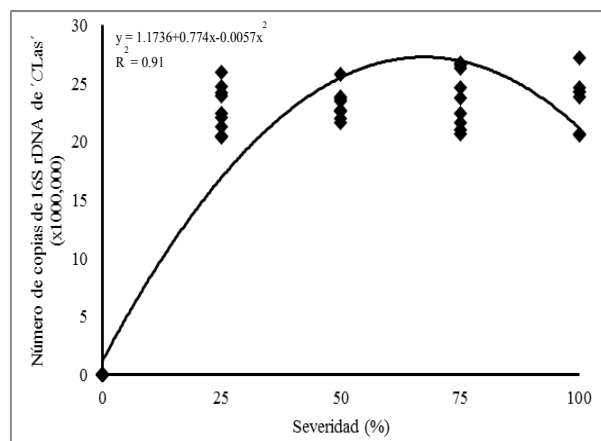


Figura 2. Correlación de la severidad del HLB en limón persa vs concentración de CLAs (número de copias del gen 16S rDNA estimada por PCR en tiempo real, en árboles sanos y enfermos con distinto grado de severidad de HLB). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

Figure 2. Correlation of the severity of HLB in Persian lime vs concentration of CLAs (number of copies of the gene 16S rDNA estimated by quantitative PCR in healthy and infected trees with different degrees of severity of HLB severity). The line and the model represent the adjustment using a quadratic regression.

Esto confirma los resultados obtenidos con PCR de punto final en los cuales la detección es exitosa solo en muestras con síntomas evidentes de la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2008); o lo contrario, como lo es la dificultad de realizar detecciones en infecciones latentes, cuando la concentración bacteriana es baja (Li *et al.*, 2008).

Estimación de pérdidas con análisis de varian-
za. Las variables peso, diámetro ecuatorial y polar, grosor de cáscara, volumen de jugo y pH fueron estadísticamente mayores en árboles sanos (T1) con respecto a frutos de ramas sintomáticas (T3) (Tukey, $P=0.05$) (Figura 3). Estos resultados muestran que la concentración bacteriana, aún en una infección reciente (15 meses), influye negativamente en las variables morfológicas y organolépticas que se evaluaron. En este efecto influye el patrón productivo del limón persa, ya que en los árboles, los frutos se concentran en ramas con crecimiento secundario en la parte externa del dosel aún con crecimiento activo (Agustí *et al.*, 1995; Davies y Albrigo, 1994).

Las variables de grados Brix y acidez titulable no fueron estadísticamente distintas entre T1 y T3. No se observó diferencia entre frutos de ramas asintomáticas y sintomáticas (T2 y T3), excepto en la variable diámetro, probablemente porque el efecto fisiológico no depende únicamente del alojamiento de CLas en el floema del tejido analizado, sino en la interferencia de la movilización de fotoasimilados por alojamiento de CLas en ramas primarias (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Entre T1 y T3 la mayor reducción fue en peso con 17.31 % y volumen de jugo con 18.62 %. En grosor de cáscara fue de 12.2 %, diámetro polar 10 % y diámetro ecuatorial 6.2 %. En el caso de las variables organolépticas solo se observó reducción en pH con 6.4 % (Cuadro 1).

the increase of bacterial inoculum of the bacteria in the plant, which explains why high HLB severity leads to a greater negative effect on the production of Persian lime (Figure 4). This confirms the results obtained with a standard PCR in which detection is successful only in samples with evident symptoms of the disease (Teixeira *et al.*, 2008); also, it explains the difficulty of carrying out these detections in latent infections, when bacterial concentration is very low (Li *et al.*, 2008).

Estimation of losses with an analysis of variance. The variables of weight, equatorial and polar diameters, thickness of skin, volume of juice and pH were statistically higher in healthy trees (T1) than in fruits from HLB symptomatic branches (T3) (Tukey, $P=0.05$) (Figure 3). These results show that bacterial concentration, even in a recent infection (15 months), has a negative influence on the morphological and organoleptic evaluated variables. This effect is influenced by the productive pattern of the Persian lime, since in the trees the fruits are concentrated in branches with secondary growth in the external part of the canopy, even with active growth (Agustí *et al.*, 1995; Davies and Albrigo, 1994).

The variables of Brix degrees and titratable acidity were not statistically different between T1 and T3. No differences were observed between fruits from symptomatic and asymptomatic branches (T2 and T3), except in the variable of diameter, probably because the physiological effect does not depend only on the hosting of CLas in the phloem of the analyzed tissue, but also on the interference of the mobilization of photoassimilates due to the hosting of CLas in primary branches (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Between T1 and T3 the greatest reduction was in weight (17.31 %) and volume of juice (18.62 %). In skin thickness,

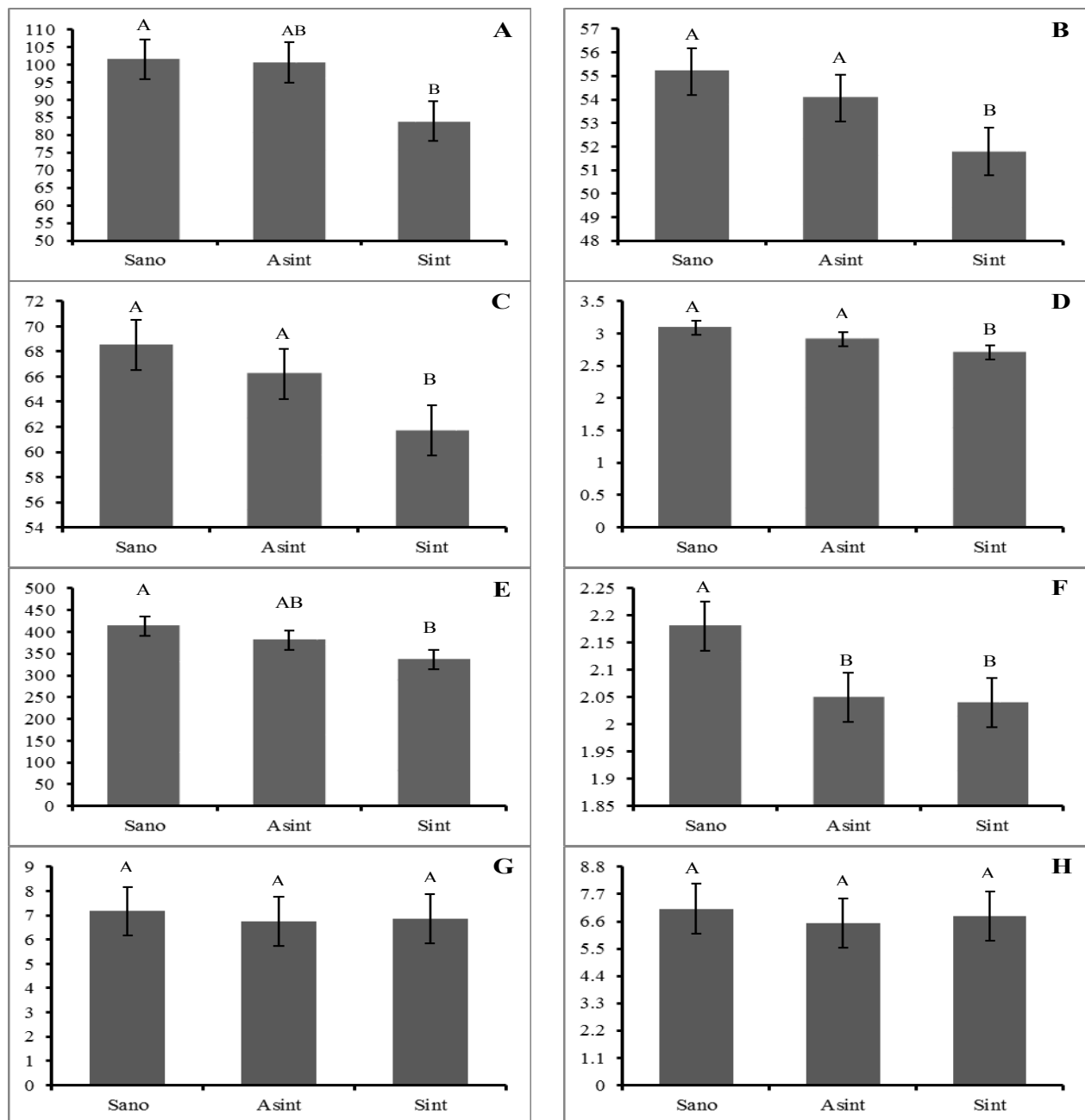


Figura 3. Comparación de medias de peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D), volumen de jugo (E), pH (F), Grados Brix (G) y acidez titulable (H) evaluadas en frutos de limón persa (*C. latifolia*) provenientes de árboles sanos y de ramas sintomáticas y asintomáticas de árboles positivos a CLAs. Para cada variable, barras con al menos una letra en común son estadísticamente iguales Tukey ($P= 0.05$). Las líneas en las barras representan el error típico.

Figure 3. Comparison of average of weight (A), equatorial diameter (B), polar diameter (C), thickness of skin (D), volume of juice (E), pH (F), Brix degrees (G), and titratable acidity (H) evaluated in Persian lime fruits (*C. latifolia*) from healthy trees and symptomatic and asymptomatic branches of trees infected by CLAs. For each variable, bars with at least one letter in common are statistically equal, Tukey ($P= 0.05$). The lines on the bars represent the standard error.

Cuadro 1. Efecto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en variables morfológicas y organolépticas de frutos de limón persa (*C. latifolia*).**Table 1.** Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on morphological and organoleptic variables of Persian lime fruits (*C. latifolia*).

| Factor | Peso | DE* | DP | GC | VJ | Brix | pH | Acidez |
|--------------------------|----------------------|--------|--------|--------|---------|-------|-------|--------|
| T1 | 101.5 a [†] | 55.2 a | 68.5 a | 3.1 a | 413.8 a | 7.2 a | 2.2 a | 7.1 a |
| T2 | 100.5 ab | 54.1 a | 66.2 a | 2.1 ab | 380 ab | 6.8 a | 2.1 b | 6.5 a |
| T3 ^{††} | 83.9 b | 51.8 b | 61.7 b | 2.7 b | 336.8 b | 6.9 a | 2.0 b | 6.8 a |
| Reducción ^{†††} | 17.31 | 6.16 | 9.95 | 12.20 | 18.62 | 4.32 | 6.42 | 4.22 |

[†] Valores con al menos una letra en común en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). ^{††} Factor T1 (sano), T2 (asintomático) y T3 (sintomático) fueron confirmados por PCR en tiempo real. ^{†††} El porcentaje se calculó con la diferencia de medias entre frutos de árboles sanos y de ramas sintomáticas. *DE=Diámetro Ecuatorial, DP=Diámetro Polar, GC= Grosor de Cáscara, VJ= Volumen de Jugo / [†] Values with at least one letter in common in the columns are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$). ^{††} Factor T1 (healthy), T2 (asymptomatic), and T3 (symptomatic) were confirmed by real time PCR. ^{†††} The percentage was calculated with the difference of averages between fruits from healthy trees and symptomatic branches. *ED= Equatorial Diameter, PD= Polar diameter, ST= Skin Thickness and VJ= Volume of Juice.

La reducción en las variables peso y volumen de jugo se explica por la relación fisiológica directa entre ellas, ya que a mayor peso de fruto mayor es el volumen de jugo (Davies y Albrigo, 1994). El efecto de CLAs en T3 en comparación con T1 (Cuadro 1) se traduce en pérdidas en la producción del 17.3 % por año productivo, más de lo que Salcedo *et al.* (2010) estimaron en ausencia de la enfermedad, ya que en su estudio indicaron que ocurrirían pérdidas del 17.6 % en cítricos agrios y 52.7 % en naranja dulce hasta después de cinco años del ingreso de CLAs a México. Además, dichos investigadores explicaron que el mayor impacto productivo del HLB sobrevendría en naranja dulce; esta observación posiblemente obedeció a la falta de información de escenarios epidémicos en cítricos agrios y a que se utilizaron datos de epidemias en naranja dulce para fines comparativos.

En Brasil, Bassanezi *et al.* (2009) detectaron pérdidas en peso entre 17.5 % (Valencia temprana) y 42.3 % (Valencia tardía) por efecto de *Candidatus Liberibacter* spp. En esta región la enfermedad es endémica, lo que implica una exposición prolongada de los árboles a la infección bacteriana, ya

reduction was 12.2 %, in polar diameter 10 % and in equatorial diameter 6.2 %. In the case of organoleptic variables, there was only a drop in pH observed, with 6.4 % (Table1).

The reduction in variables of weight and juice is explained by the direct physiological relation between them, since a greater weight of the fruit implies more juice (Davies and Albrigo, 1994). The effect of CLAs in T3 in comparison to T1 (Table 1) translates into production losses of 17.3 % per productive year, more than what Salcedo *et al.* (2010) estimated in the absence of a disease, reporting losses of 17.6 % in sour citrus fruits and 52.7 % in sweet oranges, 5 years after CLAs entered Mexico. In addition, these researchers explained that the highest productive impact of HLB would be on sweet oranges; this observation possibly was due to lack of information on epidemic scenarios in sour citrus, and that data on sweet orange epidemic were used for comparative purpose.

In Brazil, Bassanezi *et al.* (2009) observed weight losses of 17.5 % (early Valencia) to 42.3 % (late Valencia) due to *Candidatus Liberibacter* spp. In this

que la detección se realizó en 2004. En el presente estudio, las pérdidas detectadas fueron similares a Valencia temprana (17.3 y 17.5 %) aun cuando la plantación evaluada presentó solamente un periodo de 6-15 meses de exposición a la infección bacteriana, por lo que las pérdidas en periodos de exposición y desarrollo de la enfermedad similares a los de Brasil podrían ser mayores en limón persa, máxime cuando la severidad de los síntomas visuales e histológicos son más intensos que los que se indican para naranja dulce (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Adicionalmente, la mayor frecuencia de brotación vegetativa de los cítricos agrios permite periodos de infección prolongados e incremento de la bacteria, debido a la asociación con infestaciones frecuentes de vectores infectivos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013).

Estimación de pérdidas con modelos correlativos. La asociación de la severidad del HLB con variables morfológicas y organolépticas se confirmó con el ajuste a modelos cuadráticos correlativos (Figura 4). A pesar de la selección apareada de árboles sanos y enfermos para evitar efectos de variabilidad en fertilidad del suelo y manejo agronómico, fue necesario eliminar datos aberrantes los cuales se asociaron con árboles de bajo vigor (12/50); no obstante lo anterior, se mantuvo un número de árboles en observación aún superior al que utilizaron en un estudio similar Bassanezi *et al.* (2009) donde se estudiaron de 14 a 21 árboles por periodo de cosecha y variedad.

Las variables que mostraron mayor correlación con la severidad fueron las morfológicas ya que se ajustaron a los modelos cuadráticos. Los modelos obtenidos en el presente estudio fueron los siguientes: $Y_{PESO} = 217.21 - 4.1958x + 0.0288x^2$, ($R^2=0.86$); $Y_{DC} = 106.75 - 1.92x + 0.014x^2$,

region the disease is endemic, implying a prolonged exposure of trees to the bacterial infection, since it was detected in 2004. In our study, the losses found were similar to early Valencia (17.3 and 17.5 %) even though the evaluated plantation presented only a period of 6-15 months of exposure to the bacterial infection; therefore, expected losses in periods of disease exposure and disease development similar to those of Brazil may be higher in Persian lime in Mexico, especially when the severity of visual and histological symptoms are more intense in Persian lime than those reports for sweet orange (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). In addition, the highest frequency of vegetative sprouting of the sour citrus fruits allows prolonged periods of infection and increase of the bacteria, due to the association with frequent infestations of infective vectors (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013).

Estimation of losses with correlative models. The association of the severity of HLB with morphological and organoleptic variables was confirmed with the fitting of correlative quadratic models (Figure 4). Despite the paired selection of healthy and infected trees to avoid variability effects in soil fertility and agronomic management, it was necessary to eliminate outliers, which were related with low-vigor trees (12/50); however, a number of trees remained under observation even superior to that used in a similar study of Bassanezi *et al.* (2009) where 14 and 21 trees were studied for each planting period and variety.

The variables that showed the highest correlation with severity were the morphological variables, since they fitted to the quadratic models. The models obtained in this study were as follow: $Y_{weight} = 217.21 - 4.1958x + 0.0288x^2$, ($R^2=0.86$); $Y_{ED} = 106.75 - 1.92x + 0.014x^2$, ($R^2=0.87$);

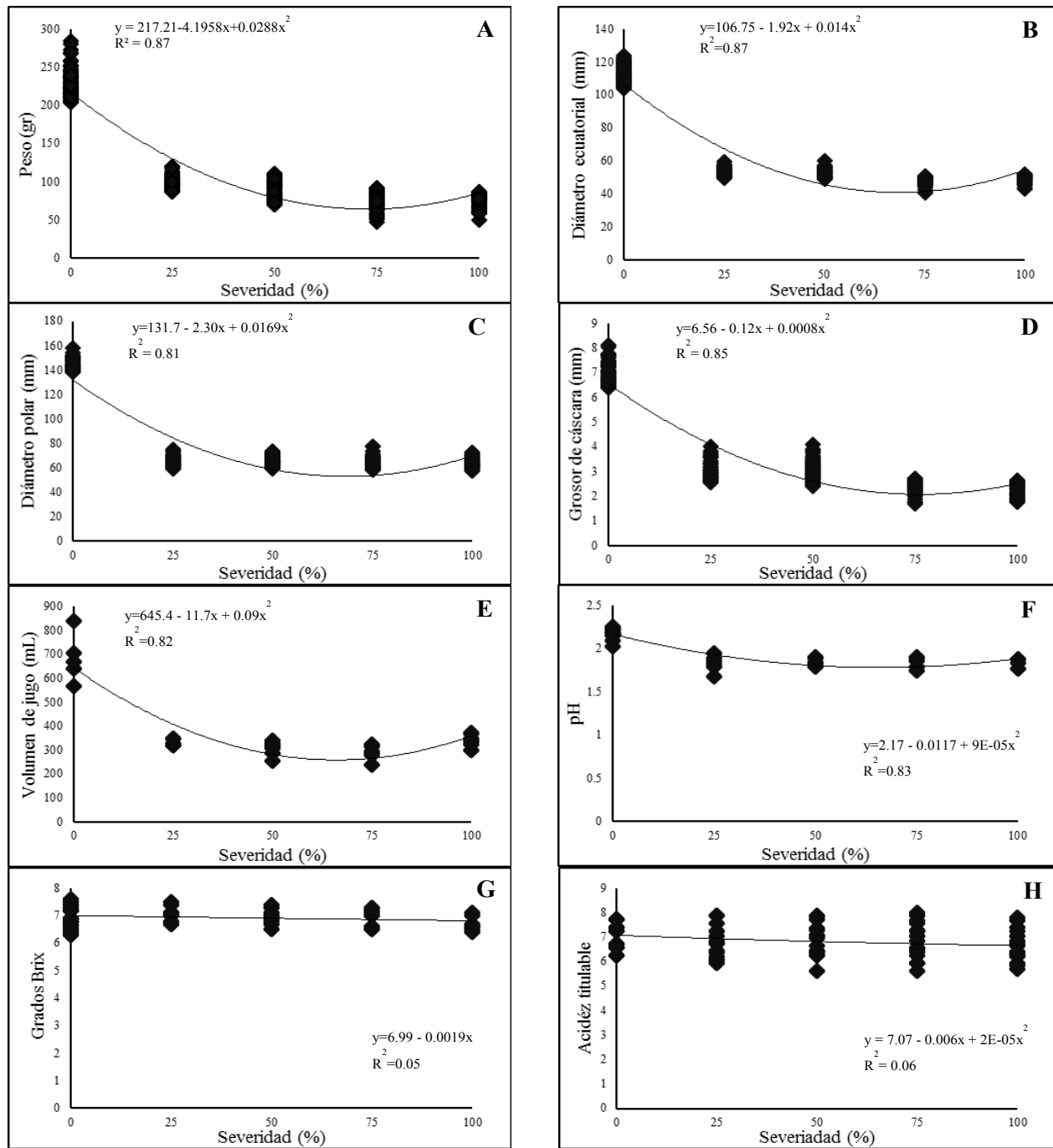


Figura 4. Correlación entre severidad de HLB y variables morfológicas: peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D) y volumen de jugo (E); y organolépticas pH (F), Grados Brix (G) y acidez titulable (H), de frutos de limón persa (*C. latifolia*). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

Figure 4. Correlation between severity of HLB and morphological variables: weight (A), equatorial diameter (B), polar diameter (C), thickness of skin (D), and volume of juice (E); Organoleptic: pH (F), Brix degrees (G) and tirtatable acidity (H), in Persian lime fruits (*C. latifolia*). The line and the model represent the adjustment using a quadratic regression.

($R^2=0.87$); $Y_{DP}=131.7-2.30x+0.0169x^2$, ($R^2=0.87$); $Y_{GC}=6.56-0.12x+0.0008x^2$, ($R^2=0.85$); $Y_{VJ}=645.4-11.7x+0.09x^2$, ($R^2=0.82$). En las variables organolépticas solo pH se ajustó con el modelo $Y_{pH}=2.17-0.0117+9E-05x^2$, ($R^2=0.83$). Grados Brix y acidez titulable no se asociaron significativamente con la severidad y tampoco se encontró un efecto claro de la bacteria sobre estas. Esto posiblemente se debió a la fisiología de frutos de limón persa, los cuales tienden a acumular bajas concentraciones de azúcares y que por la naturaleza de los desórdenes fisiológicos inducidos por CLas, se requiera un periodo de infección más prolongado para inducir una alteración detectable en estas variables (Davies y Albrigo, 1994). La variabilidad de los datos de producción debido al vigor de árboles por efectos multifactoriales de manejo se observó en un estudio similar con naranja dulce realizado en Brasil, donde la dispersión de los datos en la correlación del peso de frutos con severidad del HLB fue alta con coeficientes de determinación bajos ($R^2=0.4$) (Bassanezi *et al.*, 2011); sin embargo, en ese estudio se combinaron cosechas de diferentes años (2004-2007) con periodos distintos de endemividad (periodo de infección), lo anterior se evitó en nuestro estudio donde se obtuvo una mejoría sustancial en los coeficientes de determinación de los modelos generados.

En una infección sistémica o crónica como la que induce CLas, las pérdidas que se obtuvieron en este estudio (17.3 %) pueden aumentar con el tiempo a consecuencia del debilitamiento paulatino y muerte productiva del árbol (Da Graca, 1991; Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011). En nuestro estudio, se estimaron pérdidas en limón persa en un monto de 17.3 % después de 15 meses de ocurrir la infección; es predecible que ante la falta de medidas efectivas para el control del patógeno, anualmente el deterioro incrementará hasta probablemente superar los registros de pérdidas

$Y_{PD}=131.7-2.30x+0.0169x^2$, ($R^2=0.87$); $Y_{S_T}=6.56-0.12x+0.0008x^2$, ($R^2=0.85$); $Y_{VJ}=645.4-11.7x+0.09x^2$, ($R^2=0.82$). In the organoleptic variables, only pH fitted the model $Y_{pH}=2.17-0.0117+9E-05x^2$, ($R^2=0.83$). Brix degrees and titratable acidity did not associate significantly with severity and there were no clear effects found of the bacteria on such variables. This possibly was due to the physiology of Persian lime fruits that tend to accumulate low concentrations of sugar, and to the nature of the physiological disorders induced by CLas; thus, a more prolonged infection period may be required to induce a detectable alteration in these variables (Davies and Albrigo, 1994). The variability of the production data due to the vigor of trees by multifactor effects of management was observed in a similar study with sweet oranges carried out in Brazil, where the dispersion of data in the correlation of weights of fruits with a severity of HLB was high, with low determination coefficients ($R^2=0.4$) (Bassanezi *et al.*, 2011); however, in that study, harvests from different years were combined (2004-2007) with different periods of endemivity (periods of infection); the above it was avoided in our study where a substantial improvement is obtained in the determination coefficients of the generated models.

In a situation of systemic or chronic infection like the induced by CLas, the estimated losses in Persian lime indicated in our study are expected to increase with time due to the gradual weakening and productive tree death (Da Graca, 1991; Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011). Yield loss in Persian lime was estimated at an amount of 17.3% after 15 months of the beginning of HLB; it is predictable that in the absence of effective measures to control the pathogen, tree impairment would increase annually to probably overcome loss record indicated for sweet orange (Bassanezi *et al.*, 2011) furthermore, reach tree death. On the

indicados para naranja (Bassanezi *et al.*, 2011) y llegar hasta la muerte del árbol. Por otra parte, en un proceso epidémico del HLB se requieren varios ciclos de infección para alcanzar una incidencia del 100 % de los huertos. Es necesario que los modelos de pérdidas integren esta consideración para evitar sobreestimar los impactos de la enfermedad (Salcedo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

A quince meses de la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en un huerto de limón persa (*C. latifolia*) de la región de Tizimín, Yucatán, México, se encontró que el HLB produjo un efecto perjudicial en el tamaño, grosor de cáscara, pH, volumen de jugo y peso de los frutos. En las últimas dos variables, se encontró la mayor reducción con 18.62 y 17.31 %, en frutos de árboles con HLB en comparación con frutos de árboles sanos, en un ciclo productivo. La reducción en peso implicó una pérdida en producción de 2.4 toneladas/ha, la cual estuvo en función del incremento de la severidad del HLB en el dosel del árbol ($R^2=0.8-R^2=0.87$), y de la concentración bacteriana, la cual se estimó por PCR cuantitativo. Este estudio constituye la primera evidencia cuantitativa del efecto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa, bajo la condición de reciente ingreso en México.

Agradecimientos

A la instancia financiadora y becaria FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591 y CONACYT; a los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de la Península de Yucatán por el apoyo logístico brindado; a Edwin Hernández Chan por su apoyo en campo y laboratorio. A miembros del GIIC por su apoyo en la planeación y Aurelia Herrera López en medición de acidez titulable.

other hand, an endemic process of HLB requires various infection cycles to achieve an incidence of 100 % of the orchards; therefore models to estimate losses must integrate this consideration to avoid overestimating the impacts of HLB. This principle has already been applied in the study (Salcedo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

Fifteen months after the detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in an orchard of Persian lime (*C. latifolia*) in the region of Tizimin, Yucatan, Mexico, it was found that HLB had a detrimental effect on the size, thickness of skin, pH, volume of juice and weight of the fruit. In the two latter variables, the greatest reduction was found with 18.62 and 17.31 % in fruit trees with HLB in comparison with fruits from healthy trees, in a productive cycle. The weight reduction implicate a 2.4 tons/ha yield loss, which is related to the severity of HLB in the canopy tree ($R^2=0.8-R^2=0.87$), and on the bacterial concentration, which was estimated using quantitative PCR. This study constitutes the first quantitative evidence of the effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on Persian limes, under the condition of recent invasion of Mexico.

Acknowledgements

For the scholarship and financing granted by FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591, and CONACYT; to the State Committees of Plant Health of the Yucatan Peninsula, for the logistical support provided; to Edwin Hernández Chan for his support on the field and in the lab. To the members of the GIIC for their support in planning, and Aurelia Herrera López for measuring titratable acidity.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Agustí M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R y Staub R. 1995. Escala BBCH para la Descripción de los Estadios Fenológicos del Desarrollo de los Agrios (Gén. Citrus). *Levante Agrícola* 332, 189-199.
- Bassanezi RB, Montesino LH and Stuchi ES. 2009. Effects of Huanglongbing on Fruit Quality of Sweet Orange Cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125:565-572.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Godoy GMC, Filho AB and Amorin L. 2011. Yield Loss Caused by Huanglongbing in Different Sweet Orange Cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130:577-586.
- Bové MJ. 2006. Huanglongbing: a Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.
- Brlansky HR, Dewdney EMM, Rogers M and Chung RK. 2009. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. USA. 3p.
- Cristóbal AJ, Mora AG, Manzanilla LRH, Marbán MN, Sánchez GP, Cid del Prado VI and Evans K. 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. *Nematology* 8:727-737.
- Da Graca JV. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 29: 109-136.
- Davies FS and Albrigo LG. 1994. Citrus. Wallingford: CAB International. 254p.
- DGSV-CNRF. (Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). 2008. Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. DGSV. 17p.
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
- Gottwald TR, Da Graça JV and Bassanezi RB. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Ann. Rev. Entomol* 58:413-432.
- Halbert SE and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllid (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87: 330-53.
- Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207-223.
- Helrich K. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: 2. Food composition; additives; natural contaminants. 15th Edition. AOAC: Arlington. 865-1298 pp.
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for Detection and Identification of *Candidatus Liberibacter* Species Associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.
- Li W, Li D, Twieg E, Hartung JS and Levy L. 2008. Optimized Quantification of Unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. In Host Plants Using Real-Time PCR. *Plant Disease* 92:854-861.
- Mora-Aguilera G, Robles-González P, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Flores-Sánchez JL, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S y González-Gómez R. 2013. Situación Actual y Perspectivas de Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(Suplemento) S6:S12.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia V, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su Dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 15-31.
- Salcedo BDR, Hinojosa G, Mora AG, Covarrubias GI, DePaolis F, Cintora GC y Mora FS. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Cítrica Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
- Teixeira DC, Saillard CC, Couture EC, Martins NA, Wulff S, Jagoueix E, Yamamoto APT, Ayres J and Bové MJ. 2008. Distribution and Quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, Agent of Huanglongbing Disease of Citrus in São Paulo State, Brasil, in Leaves of an Affected Sweet Orange Tree as Determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150.
- Trujillo AJ. 2010. Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. *In: Memorias del 2º Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos*. Mérida, Yucatan, México p. 141-149.

# Epidemiología de la mancha vellosa (*Mycosphaerella caryigena*) y su impacto en la defoliación del nogal pecanero

## Epidemics caused by *Mycosphaerella caryigena* and their impact in defoliation pecan tree

José Alfredo Samaniego-Gaxiola<sup>1§</sup>, Heriberto Aguilar-Pérez<sup>2</sup>, Aurelio Pedroza-Sandoval<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación Regional Norte Centro-INIFAP, km 17 carretera Torreón-Matamoros, Coahuila. C. P. 27440 Tel: 871 82-30-81. <sup>2</sup>Junta Local de Sanidad Vegetal de Zaragoza, del Estado de Coahuila Km 12 Carretera Zaragoza Cd. Acuña. Cp. 26450, Zaragoza, Coah. Tel. 01 (862) 621-25-11, 626-04-50. <sup>3</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. Carretera Gómez Palacio-Cd. Juárez, Chihuahua, km 38.5, C. P. 35230. Tel: (872) 77-60-190. Fax. (872) 77-600-43. Bermejillo, Durango. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

Recibido: Marzo 30, 2015.

Aceptado: Junio 29, 2015.

Samaniego-Gaxiola JA, Aguilar-Pérez H y Pedroza-Sandoval A. 2015. Epidemiología de la mancha vellosa (*Mycosphaerella caryigena*) y su impacto en la defoliación del nogal pecanero. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 211-218.

**Resumen.** En el nogal pecanero, el hongo *Mycosphaerella caryigena* es el agente causal de la mancha vellosa, el cual induce lesiones en el follaje hasta causar la defoliación. En los años 1998, 1999 y 2014, se evaluaron nueve modelos epidemiológicos de lesión/hoja vs tiempo. En 1992, se ensayaron modelos epidemiológicos para la captura de esporas vs tiempo. En 1998, también se evaluó lesiones/hoja vs defoliación y defoliación vs tiempo. Las epidemias de 1998, 1999 y 2014 ajustaron a los modelos Logístico Ln, Gompertz y Logístico Ln, respectivamente. La defoliación del nogal por *M. caryigena* en 1998 inició en agosto y culminó con 95 % en septiembre. Los modelos Gompertz y Log<sub>10</sub> tuvieron el mejor ajuste para defoliación vs

**Abstract.** In the pecan tree, the fungus *Mycosphaerella caryigena* is the causal agent of the pecan downy spot, which causes injury on foliage and defoliation. In the years 1998, 1999 and 2014, ten epidemiological models of lesion/leaf vs time were evaluated. In 1992, epidemiological models were tested for the capture of spores vs. time. In 1998, lesions / leaf defoliation and defoliation vs time was also evaluated. The epidemics of 1998, 1999 and 2014 fitted the models of Logistic Ln, Gompertz and Logistic Ln, respectively. Defoliation of pecan tree by *M. caryigena* began in August 1998 and ended with 95 % in September. The Gompertz and Log<sub>10</sub> models were the best fit for defoliation vs time and lesions/leaf vs defoliation with  $R^2$  0.924 and 0.937, respectively. The capture of spores of *M. caryigena* was > 50 % from April to May; the monomolecular model was the best fit to the capture of spores ( $R^2$  0.948). The lesions/leaf appeared in June and were > 100 in September, just when the defoliation reached > 90 %. The models lesions/leaf vs time, suggest prolonged periods to

tiempo y lesiones/hoja vs defoliación con  $R^2$  0.924 y 0.937, respectivamente. La captura de esporas de *M. caryigena* fue > 50 % de abril a mayo; el modelo monomolecular fue el que mejor ajustó a la captura de esporas ( $R^2$  0.948). Las lesiones/hoja aparecieron en junio y fueron > 100 en septiembre justo cuando la defoliación alcanzó > 90 %. Los modelos lesiones/hoja vs tiempo, sugieren períodos prolongados para producir el inóculo y de incubación del hongo en la hoja, lo cual coincide con lo que se conoce del ciclo de la enfermedad.

**Palabras clave:** Hongos, follaje, enfermedades.

El norte de los estados de Coahuila y de Nuevo León, México, son zonas húmedas y cálidas donde se cultiva el nogal pecanero (*Carya illinoensis*) (Wangenh.) K.Koch en una superficie aproximada de 10 mil ha (SAGARPA, 2013). Ambas zonas son favorables para patógenos foliares del nogal, entre los que destacan *Fusicladium effusum* G. Winter, agente causal de la costra o roña; *Cercospora fusca* F.V. Rand, mancha café; *Gnomonia dispora* Demaree & Cole, mancha de las venas de la hoja; *Colletorichum* spp., antracnosis; *Microsphaera penicillata* (Wallr.) Lév. y *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, moho o mildiu; y la mancha vellosa por *Mycosphaerella caryigena* Demaree & Cole, respectivamente (Aguilar-Pérez, 2014).

La mancha vellosa junto con la roña son las enfermedades foliares más importantes del nogal en México y en Estados Unidos de Norteamérica (Aguilar-Pérez, 2014; Latham, 1982; Sparks, 1995).

Las especies de *Mycosphaerella*, que atacan el follaje de los cultivos agrícolas, afectan negativamente su fisiología y en el caso particular del nogal prematuramente lo defolian, lo que afecta el rendimiento y calidad de la nuez durante el mismo

produce the inoculum and the incubation of the fungus on the leaf, which coincides with what is known of the disease cycle.

**Key words:** Fungi, foliage, diseases.

The northern areas of the states of Coahuila and Nuevo León, Mexico, are humid and warm areas in which the pecan tree (*Carya illinoensis* Wangenh. K.Koch) is grown in a surface of approximately 10,000 ha (SAGARPA, 2013). Both areas are favorable for foliar pathogens of the pecan tree, the most prominent being *Fusicladium effusum* G. Winter, causal agent of scabs; *Cercospora fusca* F.V. Rand, brown spot; *Gnomonia dispora* Demaree & Cole, stains in the veins of the leaf; *Colletorichum* spp., anthracnose; *Microsphaera penicillata* (Wallr.) Lév. and *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, mildew; and the downy spot caused by *Mycosphaerella caryigena* Demaree & Cole, respectively (Aguilar-Pérez, 2014).

Downy spots, along with scabs, are the most important foliar diseases of the pecan tree in Mexico and the United States (Aguilar-Pérez, 2014; Latham, 1982; Sparks, 1995).

The species of *Mycosphaerella* that attack the foliage of agricultural crops affect their physiology in a negative manner. In the case of the pecan tree, *Mycosphaerella* causes premature defoliation affecting the yield and quality of the nut throughout that year and the following one (Andersen *et al.*, 1990; Pinkard y Mohammed, 2006; Rodríguez-Gaviria and Cayón, 2008).

In Northern Coahuila, it has been confirmed that the leaves of the pecan tree can have spots or lesions caused by *M. caryigena* that, when ripe, cause the leaves to fall (Aguilar-Pérez, 2014). The study of the epidemiology of the disease will contribute to improve its management, particularly the levels of inoculum and seasons in which the

y siguiente año (Andersen *et al.*, 1990; Pinkard y Mohammed, 2006; Rodríguez-Gaviria y Cayón, 2008).

En el norte de Coahuila, se ha consignado que las hojas del nogal pueden tener manchas o lesiones provocadas por *M. caryigena*, que al madurar provocan la caída del follaje (Aguilar-Pérez, 2014). El estudio de la epidemiología de la enfermedad contribuirá a su mejor manejo, particularmente los niveles de inóculo y época en los que la enfermedad causa daño (defoliación) al nogal. Los objetivos del presente se encaminan al análisis de epidemias de la mancha vellosa en nogal (lesiones/hoja), la captura de esporas a través del tiempo y el uso potencial de ambas para estimar la defoliación prematura del cultivo.

El estudio se efectuó en las huertas de nogal: SEZAR-INIFAP (1998), Santo Cristo (1999) y el Caracol (2014) localizadas en los municipios de Zaragoza, Villa Unión y Zaragoza, Coahuila, respectivamente. En cada huerta se seleccionaron cinco árboles en las áreas con antecedentes de mancha vellosa. En cada árbol se contabilizaron las lesiones provocadas por *M. caryigena* (manchas/hoja) en las hojas de 10 brotes seleccionados al azar. Para cada año (1998, 1999 y 2014), los recuentos de lesiones se realizaron de abril hasta finales de septiembre. Los datos del recuento de las lesiones se procesaron para determinar el modelo epidemiológico (lesiones vs tiempo) con mejor ajuste. Los modelos ajustados fueron Monomolecular, Gompertz, Logístico, Exponencial,  $\log_{10}$  y los primeros cuatro en donde a la variable tiempo se le aplicó el logaritmo natural (Ln) (Campbell y Madden, 1990). Asimismo, en el follaje de los árboles de la huerta SEZAR-INIFAP se cuantificó la defoliación en una escala visual 1, 2, 3, 4 y 5 en donde el follaje en el árbol fue > 90, 90-50, < 50-25, < 25-10 y 0 %, respectivamente. Los modelos epidemiológicos mencionados, se corrieron para los datos de

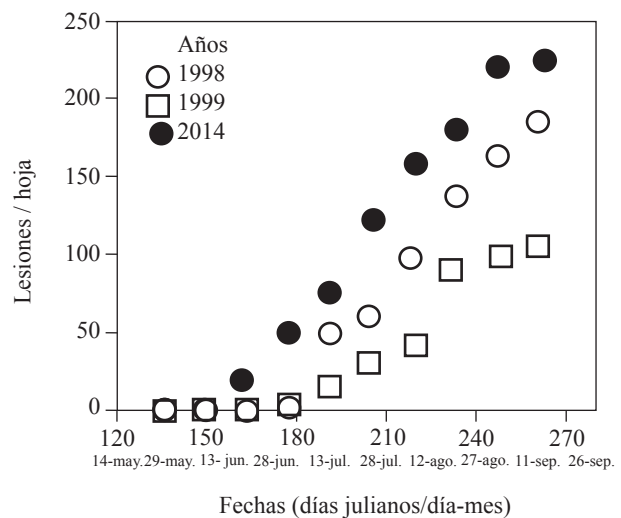
disease causes damage (defoliation) to the tree. The aims of this investigation lead us to the analysis of downy spot epidemics in the pecan tree (lesions/leaf), the capture of spores in time and the potential use of both to estimate the premature defoliation of the crop.

The study was carried out in the pecan tree orchards in SEZAR-INIFAP (1998), Santo Cristo (1999), and el Caracol (2014) located in the municipal areas of Zaragoza, Villa Unión, and Zaragoza, Coahuila, respectively. In each orchard, five trees were selected in the areas with downy spot backgrounds. The lesions caused by *M. caryigena* (spot/leaf) in each tree were counted in the leaves of 10 sprouts randomly chosen. For each year (1998, 1999, and 2014), the lesions were counted between April and late September. The data of the lesion count were processed to determine the epidemiological model (lesions vs time) with a better adjustment. The adjusted models were Monomolecular, Gompertz, Logistic, Exponential,  $\log_{10}$ , and in the first four the natural logarithm (Ln) (Campbell and Madden, 1990) was applied to the variable of time. Likewise, in the foliage of the trees in the orchard SEZAR-INIFAP, defoliation was quantified on a visual scale 1, 2, 3, 4, and 5, where the foliage in the tree was > 90, 90-50, < 50-25, < 25-10, and 0 %, respectively. The epidemiological models mentioned were run for the data on defoliation vs time and lesions. In 1992, in the orchard of Santo Cristo, the spores of *M. Caryigena* were captured. This capture was carried out using a vane-style spore trapper with a hygrothermograph cylinder, where the spores were counted for 24 h on a sheet of graph paper containing Vaseline. The base of the trapper contained an inverted fan for air suction, which entered the cylinder through an orifice located approximately 60 cm from the floor. This trapper worked with a car battery, and was placed in the

defoliación vs tiempo y lesiones. En 1992, en la huerta Santo Cristo, se capturaron las esporas de *M. caryigena*. La captura de esporas se realizó con un trampeador de esporas tipo veleta con un cilindro de higrotermógrafo, donde se contabilizaron las capturas durante 24 h en un papel milimétrico impregnado con vaselina. El trampeador contenía en la base un ventilador invertido para la succión de aire, el cual entraba al cilindro por un orificio ubicado aproximadamente a 60 cm del suelo. Este trampeador funcionaba con una batería de automóvil y se colocó al centro del área de goteo de un árbol en el centro de la huerta; las capturas de 1992, se realizaron de marzo a septiembre y se expresan como esporas/día. Los datos de las esporas capturadas se ajustaron a los modelos señalados.

La dinámica de lesiones/hoja a través del ciclo del cultivo, en las tres huertas y años correspondientes, se indican en la Figura 1. Las lesiones se caracterizaron por ser manchas cloróticas circulares con aspecto aceitoso y diámetro de 3 a 6 mm, que se tornan plateadas y posteriormente café claro. En las tres huertas la defoliación después de la mitad del mes de septiembre fue mayor al 90 %. Las lesiones en la hoja siempre aparecieron a finales del mes de junio y más de 100 lesiones/hoja se contabilizaron hacia mediados de septiembre Cuadro 1. Al ajustar los datos de la Figura 1 a los modelos epidemiológicos, resultó que para las epidemias de 1998, 1999 y 2014 los modelos con mejor ajuste fueron Logístico Ln, Gompertz y Logístico Ln, respectivamente (Cuadro 2).

La defoliación prematura provocada por *M. caryigena* en los nogales durante 1998 de la huerta SEZAR-INIFAP inició a mediados de agosto y alcanzó un máximo de 95 % a finales de septiembre. Los modelos Gompertz y modelo  $\text{Log}_{10}$  fueron los de mejor ajuste para defoliación vs tiempo y lesiones/hoja vs defoliación con  $R^2$  0.924 y 0.937, respectivamente.



**Figura 1.** Dinámica de lesiones/hoja por fecha durante los años 1998, 1999 y 2014.

**Figure 1.** Dynamics of lesions/leaf by date in 1998, 1999, and 2014.

middle of a tree's dripping area in the middle of the orchard; the 1992 captures were carried out between March and September and are expressed as spores/day. The data of the spores captured were adjusted to the models pointed out.

The dynamics of lesions/leaf throughout the plating cycle in the three orchards in the corresponding years are presented in Figure 1. The lesions are round chlorotic spots with an oily appearance and a diameter of 3 to 6 mm that turn silvery and then light brown. In all three orchards, defoliation after mid September was over 90 %. The lesions always appeared on the leaves in late June and over 100 lesions/leaf were counted towards mid-September (Table 1). When adjusting the data of Figure 1 to the epidemiological models, it turned out that for the epidemic of 1998, 1999, and 2014, the best-adjusted models were Logistic Ln, Gompertz, and Logistic Ln, respectively (Table 2).

Premature defoliation caused by *M. caryigena* in pecan trees during 1998 in the orchard of

**Cuadro 1.** Fechas de inicio de las primeras lesiones/hoja provocadas por *M. caryigena*, y fecha final en la que se alcanzan más de 100 lesiones/hoja durante distintos años.

**Table 1.** Starting dates of the first lesions/leaf caused by *M. caryigena*, and final date in which more than 100 lesions/leaf are reached in different years

|        | Fechas en:    |          | Lesiones por años |      |      |
|--------|---------------|----------|-------------------|------|------|
|        | Días julianos | Mes-días | 1998              | 1999 | 2014 |
| Inicio | 177           | 25-jun   | 2                 | 5    | 49   |
| Final  | 261           | 17-sep   | 185               | 105  | 225  |

En la huerta Santo Cristo, la captura de esporas de *M. caryigena* de mediados de abril a mediados de mayo fue más del 50 % del total de esporas capturadas (Figura 2); el modelo monomolecular fue el que mejor ajustó a la captura de esporas vs tiempo, con una  $R^2$  0.948, lo que sugiere que la fuente de inóculo proviene de la descarga de esporas a partir de un solo punto.

Los datos presentados en el Cuadro 1, indican que la enfermedad inicialmente se manifiesta durante junio y que al alcanzar 100 o más manchas/hoja en agosto provocará por lo menos 90 % de defoliación.

Los modelos de predicción para las enfermedades provocadas por *Mycosphaerella* spp. son útiles para el manejo de las enfermedades en los cultivos

SEZAR-INIFAP began in mid-August and reached a maximum of 95 % towards the end of September. The models Gompertz and model  $\text{Log}_{10}$  had the best adjustments for defoliation vs time and lesions/leaf vs defoliation with  $R^2$  0.924 y 0.937, respectively.

In the orchard of Santo Cristo, the capture of *M. caryigena* spores, from mid-April to mid-May accounted for over 50 % of the total of spores captured (Figure 2); the monomolecular model was the best adjusted to the capture of spores vs time, with a  $R^2$  0.948, suggesting that the source of inoculum comes from the discharge of spores from one point.

The data in Table 1 indicate that the disease initially manifested itself in June, and that after reaching 100 or more spot/leaf in August, the disease will cause a defoliation of at least 90 %.

The prediction models for the diseases caused by *Mycosphaerella* spp. are useful. The model developed by Salam *et al.* (2009) determined that when capturing more than 40 % of *Mycosphaerella pinodes* ascospores, cause significant damage to pea (*Pisum sativum* L) plantations. The data on Figure 2 suggest that around 50 % of the *M. caryigena* spores are produced in April-May and cause significant damage (defoliation) three months later. When measuring the effects of the downy spot on the pecan tree, foliage discoloration,

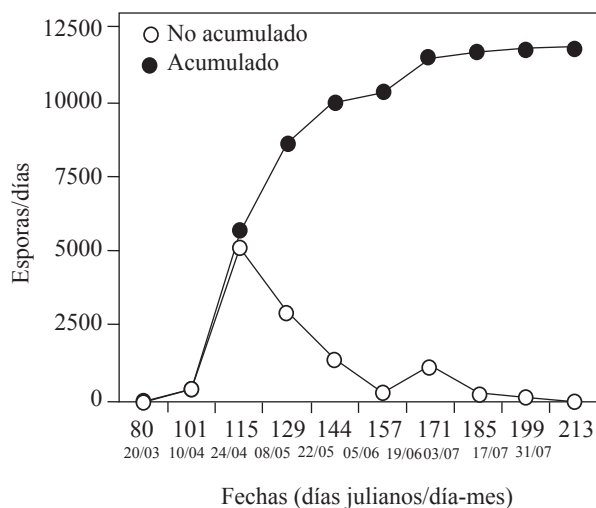
**Cuadro 2.** Modelos epidemiológicos y su ajuste a las epifitias (lesiones/hoja) en distintos años, números en negritas modelo con mejor ajuste ( $R^2$ ).

**Table 2.** Epidemiological models and their adjustment to the epifitias (lesions/leaf) in different years, numbers in bold with better adjustment ( $R^2$ ).

| Año  | Modelos <sup>£</sup> |        |       |         |       |              |              |         |                   |
|------|----------------------|--------|-------|---------|-------|--------------|--------------|---------|-------------------|
|      | Exp                  | Exp Ln | Mono  | Mono Ln | Logis | Logis Ln     | Gomp         | Gomp Ln | $\text{Log}_{10}$ |
| 1998 | 0.811                | 0.873  | 0.811 | 0.744   | 0.971 | <b>0.977</b> | 0.938        | 0.899   | 0.954             |
| 1999 | 0.765                | 0.823  | 0.854 | 0.794   | 0.929 | 0.954        | <b>0.968</b> | 0.943   | 0.944             |
| 2014 | 0.747                | 0.796  | 0.826 | 0.782   | 0.930 | <b>0.947</b> | 0.940        | 0.919   | 0.912             |

<sup>£</sup> Los modelos: Exp, Mono, Logis, Gomp y  $\text{Log}_{10}$ , corresponden a Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz, respectivamente. Los primeros cuatro modelos se les aplicaron logaritmo natural (Ln) / <sup>£</sup>The models: Exp, Mono, Logis, Gomp, and  $\text{Log}_{10}$ , correspond to Exponential, Monomolecular, Logistic and Gompertz, respectively. The first four models were applied a natural logarithm (Ln).





**Figura 2.** Captura de esporas de *M. caryigena* durante el año 1992 en la huerta Santo Cristo, municipio de Villa Unión Zaragoza, Coahuila. Acumulado, o suma de esporas capturadas; no acumulado, esporas capturadas en la fecha de muestreo.

**Figure 2.** Capture of *M. caryigena* spores in 1992 in the Santo Cristo orchard, in the municipal area of Villa Unión Zaragoza, Coahuila. Accumulated, or amount of spores captured; not accumulated, spores captured in the date of sampling.

agrícolas, destaca el modelo desarrollado por Salam *et al.* (2009) en donde determinaron que al capturar más del 40 % de ascosporas de *Mycosphaerella pinodes* causa daño significativo al cultivo de chícharo (*Pisum sativum* L). Los datos de la Figura 2 sugieren que alrededor del 50 % de las esporas de *M. caryigena* se producen durante abril-mayo, lo que causa un daño significativo (defoliación) tres meses después. Al medir los efectos de la mancha vellosa en el nogal pecanero, también podría tomarse en cuenta la decoloración del follaje, su necrosis y defoliación para integrarse en un mejor modelo de daño, semejante al desarrollado para el *Eucalyptus* spp. en Australia (Stone *et al.*, 2003).

Ambos modelos, Logístico Ln y Gompertz son variante del modelo logístico. En el primero, el tiempo se ajusta logarítmicamente, en el segundo, la parte exponencial de la epifitias se adelanta o retrasa

its necrosis, and defoliation could also be taken into account in a better damage model, similar to the one developed for *Eucalyptus* spp. in Australia (Stone *et al.*, 2003).

Both models, Logistic Ln and Gompertz, are variants of the logistic model; in the first one, the exponential part of the epidemic comes early or late in time compared to the logistic model. In this investigation, the two models that predominated in lesions/leaf vs time, along with the periods of latency, weeks long, allocated for *M. caryigena* (Goff *et al.*, 1987) suggest that the appearance of the symptoms is delayed in time, if we consider that the spores in the environment are abundant between March and May (Figure 2). The inoculum of *M. caryigena* is known to be produced in the leaves that fall to the ground and hibernate (months), where pseudothecia form, grow, and finally release ascospores (Goff *et al.*, 1987).

Downy spots have a wide variability, both in the manifestation of lesions/leaf and in defoliation. For example, in the years 2000 and 2005, a variation of 50 to more than 300 lesions/lea was recorded, respectively (data not shown).

Downy spots are currently handled using preventive, curative, and unconventional (plant extract) fungicides, as well as with the use of pecan trees that are resistant to the disease (Aguilar-Pérez, 2014).

The use of fungicides in *Mycosphaerella* spp. has caused a resistance to the fungus (Aguilar-Barragán *et al.*, 2014); to avoid a possible resistance of *M. caryigena*, plant extracts was evaluated for their use on the pecan tree (Aguilar-Pérez, 2008; Patiño *et al.*, 2007).

Being able to record weather factors such as temperature, humidity, and wind inside the orchards, related to downy spots in the pecan tree, will undoubtedly help to optimize and predict the disease-environment-time models.

en el tiempo al compararlo con el modelo logístico. En este trabajo, los dos modelos que predominaron en lesiones/hoja vs tiempo, aunado a los períodos de latencia de semanas consignado para *M. caryigena* (Goff *et al.*, 1987) nos sugieren que la aparición de los síntomas se retarda en el tiempo, si consideramos que las esporas en el ambiente son abundantes desde marzo a mayo (Figura 2). Se sabe que el inóculo de *M. caryigena* se produce en el follaje que cae al suelo e inverna (meses), en donde se forman y maduran pseudotecios que finalmente liberan ascosporas (Goff *et al.*, 1987).

La mancha vellosa tiene una variabilidad amplia tanto en la manifestación de lesiones/hoja como en la defoliación. Por ejemplo, durante los años 2000 y 2005 se registró una variación de 50 a más de 300 lesiones/hoja, respectivamente (datos no mostrados).

El manejo de la mancha vellosa actualmente se hace con fungicidas preventivos, curativos y no convencionales (extractos de plantas) y con el uso de variedades de nogal resistentes a la enfermedad (Aguilar-Pérez, 2014).

El manejo de las enfermedades provocadas por *Mycosphaerella* spp. usando fungicidas ha ocasionado resistencia del hongo (Aguilar-Barragán *et al.*, 2014), para evitar una posible resistencia de *M. caryigena*, se evaluaron extractos de plantas para su control en el nogal pecanero (Aguilar-Pérez, 2008; Patiño *et al.*, 2007).

El poder registrar factores del estado del tiempo como temperatura, humedad y viento dentro de las huertas de nogal asociados a la mancha vellosa en el nogal, sin duda ayudarían a optimizar y predecir modelos de enfermedad-ambiente-tiempo. Otra asignatura pendiente lo es la parte taxonómica de *Mycosphaerella* en el nogal pecanero, pues al respecto no se tienen estudios en México. Las especies de *Mycosphaerella* constantemente se están reubicando taxonómicamente, debido a que el

Another unresolved theme is the taxonomic part of *Mycosphaerella* in the pecan tree, since there is no study on this in Mexico. The *Mycosphaerella* species are constantly being taxonomically relocated, since the genus has a polyphyletic origin, anamorphic states and species encrypted, all in relation to its pathogenesis in susceptible agricultural crops (Crous, 2009; Crous *et al.*, 2004 and 2007).

In short, the *M. caryigena* epidemics in pecan trees become evident as of June. If the lesions/leaf are 100 or more by September, defoliation will be at least 90 %.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank the SAGARPA-COANCYT Fund for funding investigation and publication of this work, which was performed through the project code 2011-13-175247.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

género tiene origen polifilético, estados anamorfo y especies encriptadas, todo ello relacionado con su patogénesis en los cultivos agrícolas susceptibles (Crous, 2009; Crous *et al.*, 2004 y 2007).

En suma, las epidemias de *M. caryigena* en el nogal pecanero se hacen evidentes a partir del mes de junio, si las lesiones/hoja son 100 o más para el mes de septiembre, la defoliación será de por lo menos un 90 %.

Agradecimientos

Los autores, agradecen al Fondo SAGARPA-CONACYT por el financiamiento de la investigación y publicación de este trabajo, el que se realizó a través del proyecto clave 2011-13-175247.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Barragán, A., García-Torres, A. E., Odriozola-Casas, O., Macedo-Raygoza, M., Tetsuya Ogura., Manzo-Sánchez, G., James, C. A., Islas-Flores, I. and Beltrán-García, M. I. 2014. Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology* 45: 359-364.
- Aguilar-Pérez, H. 2008. Fungicidas orgánicos para el control de la mancha vellosa del nogal. Ficha tecnológica por sistema producto. Páginas 75-76. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/815/289.pdf?sequence=1>.
- Aguilar-Pérez, H. 2014. Manual para el Manejo Orgánico del Nogal Pecanero. Palibrio. Estados Unidos. 274 p.
- Andersen PC, Aldrich JH and Gould AB. 1990. Impact of pecan leaf blotch on gas exchange of pecan leaves. *Plant Disease* 74: 203-207.
- Campbell CL and Madden LD. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Son. 532 p.
- Crous PW. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Diversity* 38: 1-24.
- Crous PW, Groenewald JZ, Pongpanich K, Himaman W, Arzanlou M and Wingfield MJ. 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian Acacia species grown as exotics in the tropics. *Studies in Mycology* 50: 457-469.
- Crous PW, Braun U. and Groenewald, J. Z. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.
- Goff WD, Drye CE and Miller RW. 1987. Ecology and epidemiology of pecan downy spot. *Phytopathology* 77: 491-496.
- Latham AJ. 1982. Effects of some weather factors and *Fusicladium effusum* conidia dispersal on pecan scab occurrence [*Carya illinoensis*]. *Phytopathology* 72: 1339-1345.
- Patiño LF, Bustamante E y Salazar LM. 2007. Efecto de Sustratos Foliare Sobre la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Banano (*Musa × paradisiaca* L.) y Plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica* 67: 437-445.
- Pinkard EA and Mohammed CL. 2006. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170: 119-127.
- Rodríguez-Gaviria PA y Cayón G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana* 262: 256-265.
- SAGARPA. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, 1980-2012. México, DF, 2013.
- Salam MU, Galloway J, MacLeod WJ, Seymour M, Pritchard I, Barbetti MJ and Maling T. 2009. Translating research into the field: meta-analysis of field pea blackspot severity and yield loss to extend model application for disease management in Western Australia. In APPS 2009: Plant Health Management: An Integrated Approach: Abstracts of the 17th Australasian Plant Pathology Conference (pp. 74-74). APPS.
- Sparks D. 1995. A climatic approach to pecan scab control. *Hort-Technology* 5: 225-230.
- Stone C, Parsons M, Matsuki M and Carnegie AJ. 2003. Pest and disease assessment in young eucalypt plantations: Field Manual for using the Crown Damage Index. Bureau of Rural Sciences. Australia. 30 p.

Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena

Search for sources of resistance to *Poinsettia mosaic virus* in wild poinsettia plants

Omar Jacobo Villegas, ***Guadalupe Valdovinos Ponce**, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Texcoco, Estado de México C.P. 56230, **Sergio Ramírez Rojas**, Laboratorio de Fitopatología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Campo Experimental Zacatepec, Km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana, Zacatepec, Morelos, México C.P. 62780 y **Camilo Hernández Juárez**, Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México C.P. 56230. *Correspondencia: gvapon@colpos.mx.

Recibido: Abril 01, 2015.

Aceptado: Junio 28, 2015.

Jacobo-Villegas O, Valdovinos-Ponce G, Ramírez-Rojas S y Hernández-Juárez C. 2015. Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 219-231.

Resumen. La nochebuena, como especie mejorada, es una de las plantas ornamentales de mayor importancia comercial a nivel mundial. En el 2013, el valor de su producción en México fue superior a los 416 millones de pesos; sin embargo, esta cifra puede reducirse debido a la presencia del PnMV, el cual está reportado en algunos países de América, Asia y Europa causando alteraciones foliares que demeritan su comercialización. Considerando que México importa las variedades mejoradas de nochebuena para su producción y comercialización, y que estas variedades se originaron a partir de las plantas silvestres que Robert Poinsett obtuvo del país y envió a Estados Unidos, el objetivo de esta investigación fue buscar una fuente de resistencia al virus en plantas silvestres de nochebuena. Se recolectaron plantas silvestres de nochebuena

Abstract. Poinsettia, as an improved species, is one of the most economically important ornamental plants worldwide. In 2013, the value of poinsettia production in Mexico was higher than 416 million pesos; however, this amount can be reduced by PnMV, which has been reported in some countries of the Americas, Asia and Europe inducing symptoms that affect its marketing. Taking into account that Mexico imports improved varieties of poinsettia for production and marketing, and that these varieties were developed originally from wild plants collected by Robert Poinsett in Mexico and sent them to USA, the objective of this research was to search for a virus resistant source in wild poinsettia plants. Symptomless wild poinsettia plants and plants with symptoms associated with virus were collected in four states of Mexico. DAS-ELISA and RT-PCR were done in order to determine the virus presence as well as mechanical and graft inoculations. Results showed that the wild poinsettia plants are non-hosts for PnMV, so they may be a source of resistance to this virus. This is the first report of PnMV in improved poinsettia plants in Mexico.

asintomáticas y con síntomas asociados a virus en cuatro estados de la República Mexicana. Se realizó DAS-ELISA y RT-PCR para determinar la presencia del virus, así como inoculaciones mecánicas y por injerto. Los resultados indicaron que las plantas silvestres de nochebuena no son hospedantes del PnMV, por lo que podrían representar una fuente de resistencia para este patógeno. Este es el primer reporte en México del PnMV en plantas mejoradas de nochebuena.

Palabras clave: *Euphorbia pulcherrima*, resistencia, virus.

En México, la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) se cultiva en traspatios y jardines, como especie mejorada y se encuentra en estado silvestre desde el noroeste de México hasta el sur de Guatemala (Trejo *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014). Las plantas de nochebuena que se cultivan en jardines y traspatios reciben el nombre de “nochebuena de sol”; se utilizan como plantas medicinales, flor de corte y para adornar espacios públicos (Colinas, 2009; Canul *et al.*, 2014). No se tienen datos oficiales sobre la superficie cultivada con “nochebuena de sol”. En el 2010, en el estado de Morelos, se cultivaron alrededor de 20,000 m² con mercado a nivel regional, estatal y nacional, y sin contrato para su comercialización (Galindo *et al.*, 2012).

En contraste, la nochebuena, como especie mejorada (de aquí en adelante nombrada como nochebuena comercial), es una de las plantas ornamentales de mayor importancia a nivel mundial. De acuerdo con los registros de la producción de cultivos florícolas de Estados Unidos de América, su venta en el 2013 fue de 146 millones de dólares (USDA, 2014). En este mismo año, el valor de la producción en México fue superior a los 416 millones de pesos (SAGARPA, 2014).

Key words: *Euphorbia pulcherrima*, resistance, virus.

In Mexico, poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) is cultivated in backyards and gardens, as an improved species, and is located as a wild plant from Northwestern Mexico to the South of Guatemala (Trejo *et al.*, 2012; Canul *et al.*, 2014). Poinsettia plants cultivated in gardens and backyards are known as “nochebuena de sol”; they are used as medicinal and cut flowers plants, and for decorating public spaces (Colinas, 2009; Canul *et al.*, 2014). There are no official data about the cultivated area with “nochebuena de sol”; in 2010, in the state of Morelos, they were cultivated around of 20,000 m² for regional, state and national markets, and without trade agreements (Galindo *et al.*, 2012).

In contrast, poinsettia, as an improved species (hereinafter referred as commercial poinsettias), is one of the most important ornamental plants worldwide. According to the United States of America flower production records, poinsettia sales in 2013 were \$146 million dollars (USDA, 2014). In the same year, the production value in Mexico was over \$416 million pesos (SAGARPA, 2014).

Wild poinsettia plants have been under a constant selection pressure, so they have developed some traits that add value as a genetic resource (SINAREFI, 2010) with potential for research and marketing. Therefore, it is necessary to protect and incorporate this species to genetic improvement programs (Canul *et al.*, 2010). In this regard, INIFAP at the Zacatepec Experimental Field is developing a genetic improvement program for “nochebuena de sol” and wild poinsettia plants, aimed to obtain Mexican varieties with commercial and phytosanitary features that benefit farmers.

Commercial poinsettias are regular hosts for both *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) and *Poinsettia*

La nochebuena silvestre ha estado bajo una constante presión de selección, por lo que ha desarrollado caracteres que le confieren valor como recurso fitogenético (SINAREFI, 2010) con potencial para investigación y comercialización, por lo que es necesario conservarla e incorporarla a programas de mejoramiento genético (Canul *et al.*, 2010). En este sentido, el INIFAP del Campo Experimental Zacatepec está desarrollando un programa de mejoramiento genético de plantas de “nochebuena de sol” y silvestres con la finalidad de obtener variedades mexicanas con atributos comerciales y fitosanitarios que beneficien a los productores.

La nochebuena comercial es hospedante regular del *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) y del *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005). A la fecha no se han reportado síntomas en plantas infectadas con el PnLV (aus dem Siepen *et al.*, 2005), pero el PnMV induce distorsión de brácteas, mosaico y moteado foliar, causando pérdidas importantes en la comercialización (Lebas, 2007).

En México, el estudio de virus fitopatógenos en plantas de “nochebuena de sol” y silvestres es reciente. Se tienen dos reportes en donde se asocia la presencia de estos patógenos con síntomas de clorosis, mosaico, variegado y deformación foliar. En el 2012, en un diagnóstico preliminar con inmuno-tiras, se detectaron al *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) y al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). La presencia del CMV y TMV se corroboró posteriormente con la prueba DAS-ELISA (Ocampo, 2012). En el 2013, se detectó mediante DAS-ELISA al TMV en plantas de “nochebuena de sol” que se recolectaron en Morelos, Guerrero, Distrito Federal, Michoacán, Estado de México, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Nayarit. La presencia de este virus se corroboró con RT-PCR en las plantas del Estado de México y Nayarit. También se determinó la presencia del PnMV en plantas de “nochebuena de sol” de Michoacán,

latent virus (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005). Even though no symptoms have been reported on plants infected by PnLV (aus dem Siepen *et al.*, 2005) so far, it is known that PnMV induces bracts distortion, mosaic and leaf mottling, which cause important marketing losses (Lebas, 2007).

In Mexico, research about phytopathogenic virus in “nochebuena de sol” and wild poinsettia plants is recent. There are two reports where the presence of such pathogens was associated with symptoms of chlorosis, mosaic, variegation and leaf deformation. In 2012, results of a preliminary test using immune strips showed the presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). The presence of CMV and TMV was later confirmed using DAS-ELISA (Ocampo, 2012). In 2013, TMV was detected using DAS-ELISA in “nochebuena de sol” plants collected in Morelos, Guerrero, Mexico City, Michoacán, State of Mexico, Puebla, Veracruz, Oaxaca and Nayarit. The presence of this virus was confirmed by RT-PCR in plants collected in the State of Mexico and Nayarit. PnMV was also detected in “nochebuena de sol” plants collected in Michoacán, State of Mexico, Veracruz and Oaxaca; these results were further confirmed by RT-PCR only in plants collected in Michoacán and Oaxaca (Ocampo *et al.*, 2013). In wild poinsettia plants collected in Morelos, Guerrero and Nayarit, the presence of TMV was only detected by DAS-ELISA (Ocampo, 2012).

Considering that Mexico imports commercial varieties of poinsettia for their production and commerce, that these varieties were developed from wild plants collected in Mexico, and that PnMV is one of the causes of economic losses in the production of this ornamental plant, the objective of this research was to search for a source of resistance to PnMV in wild poinsettia plants.

Estado de México, Veracruz y Oaxaca; ratificando el resultado con RT-PCR solamente en las plantas que se recolectaron en Michoacán y Oaxaca (Ocampo *et al.*, 2013). En plantas silvestres de nochebuena recolectadas en los estados de Morelos, Guerrero y Nayarit, solo se determinó la presencia del TMV con la prueba DAS-ELISA (Ocampo, 2012).

Considerando que México importa las variedades comerciales de nochebuena para su producción y comercialización, que estas variedades se originaron a partir de plantas silvestres que se colectaron en México, y que el PnMV es una de las causas de pérdidas económicas en la producción de esta ornamental, el objetivo de esta investigación fue buscar una fuente de resistencia al PnMV en plantas silvestres de nochebuena.

En 2013 y 2014 se recolectaron plantas silvestres de nochebuena asintomáticas y con síntomas asociados a virus en los municipios de Jiutepec, Morelos (10 plantas); Tehuilotepic, Guerrero (9 plantas); Xilitla, San Luis Potosí (2 plantas) y en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), en el Estado de México (11 plantas). Además se consiguieron plantas de nochebuena (como especie mejorada) de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” en la empresa “Vivero Internacional” ubicada en el estado de Morelos. A partir de dos de las nueve plantas recolectadas en Tehuilotepic y las dos obtenidas de Xilitla, se obtuvieron esquejes que se establecieron en un cubículo aislado del invernadero de virus fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

La detección del PnMV se realizó serológicamente con la prueba DAS-ELISA en hojas tiernas y raíces de todas las plantas que se recolectaron en Jiutepec y Tehuilotepic, y solamente se analizó el tejido foliar de las plantas obtenidas del invernadero de la UACH y de las plantas de nochebuena

In 2013 and 2014, wild poinsettia plants with virus-associated symptoms and symptomless were collected in Jiutepec, Morelos (10 plants); Tehuilotepic, Guerrero (9 plants); Xilitla, San Luis Potosí (2 plants), and in a greenhouse at the Chapingo Autonomous University (UACH) in the State of Mexico (11 plants). Likewise, “Freedom” and “Red Prestige” commercial poinsettia plants were got at the “Vivero Internacional” company located in Morelos state. Shoots from two out of the nine plants collected in Tehuilotepic and two from Xilitla were placed into an isolated room in the virus greenhouse of the UACH Agricultural Parasitology Department.

The PnMV was detected using DAS-ELISA in young leaves and roots of all the plants collected in Jiutepec and Tehuilotepic, and only foliar tissue from the UACH greenhouse and commercial plants (5 “Freedom” and 4 “Red Prestige” plants) was analyzed. The detection protocol was carried out following the manufacturer instructions (Reagent Set SRA 90700/0096 Agdia®). Absorbance values were measured after 60 min of incubation in an ELISA micro-plates reader (Multiskan EX, Labsystems) at 405 nm. Samples were considered positive when their absorbance values exceeded the average of the negative controls multiplied by 2 (García *et al.*, 2014).

RNA was isolated from 100 mg of leaf tissue of all the samples with the commercial Kit ZR Plant RNA MiniPrep™ (R2024 Zymo Research) by following the manufacturer protocol. In order to verify that there were no inhibitors in the ARN samples, one segment of the 18S gen was amplified using the specific primers 18SF (5'-ACG GAT CGC ACG GCC TTC GT -3) and 18SR (5'-ACC AGA CTT GCC CTC CAA TGG -3) (Zamboni *et al.*, 2008). A partial amplification of PnMV was done with PnMV-F (5'-GTG CCA GCC GCC GTT CTT CT-3') and PnMV-R primers (5'-TGA GCC GGC

comercial (5 de la variedad “Freedom” y 4 de “Red Prestige”. El protocolo de detección se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante (Reagent Set SRA 90700/0096 Agdia®). Los valores de absorbancia se midieron a los 60 minutos de incubación en un lector de micro-placas de ELISA (Multiskan EX, Labsystems) a 405 nm. Se consideraron positivas las muestras que tuvieron valores de absorbancia mayores al promedio de los controles negativos multiplicado por dos (García *et al.*, 2014).

El ARN se aisló a partir de 100 mg de tejido foliar de todas las muestras con el Kit comercial ZR Plant RNA MiniPrep™ (R2024 Zymo Research) considerando el protocolo del fabricante. Para descartar la presencia de inhibidores, se amplificó un segmento del gen 18S con los iniciadores específicos 18SF (5'-ACG GAT CGC ACG GCC TTC GT -3) y 18SR (5'-ACC AGA CTT GCC CTC CAA TGG -3) (Zamboni *et al.*, 2008). La amplificación parcial del PnMV se realizó con los iniciadores PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGCTTCT-3') y PnMV-R (5'-TGAGCCGGCGACTCCATCCA-3') (Ocampo *et al.*, 2013). El control positivo se obtuvo de plantas comerciales de nochebuena variedad “Red Prestige” mantenidas en el invernadero de virus de la UACH. El control negativo consistió en la mezcla de reacción sin el ADN complementario. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5% p/v a 100 V durante 80 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador (Vilber Lourmat, Quantum), se purificaron con el Kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega®, siguiendo el protocolo del fabricante, y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para los ensayos de transmisión, el PnMV se inoculó independientemente y de manera mecánica en cuatro plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Tehuiltepec y

GAC TCC ATC CA-3') (Ocampo *et al.*, 2013). The positive control was gotten from poinsettia commercial plants of the “Red Prestige” variety, which were kept in the UACH virus greenhouse. The negative control was the reaction mix without the complementary ADN. PCR products were resolved in an 1.5 % w/v agarose gel at 100 V for 80 min. Amplicons were visualized with an UV transilluminator (Vilber Lourmat, Quantum), purified using the commercial Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System from Promega® following the manufacturer protocol, and sent for sequencing to the UNAM Biotechnology Institute.

For transmission assays, PnMV was individually and mechanically inoculated in four wild poinsettia plants obtained from the stalks collected in Tehuiltepec and Xilitla, and from 10 species of indicator plants (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. virginia*, *N. rustica*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* and *Ch. quinoa*). The inoculum source was obtained from the “Red Prestige” and “Freedom” commercial varieties that showed the highest virus concentration, according to the serological results. Briefly, three to five young leaves were sprinkled with 600-mesh carborundum and rubbed individually with a sterile cotton swab previously dipped in the inoculum. For a negative control, carborundum was applied on the surface of the leaves, then they were rubbed with a sterile cotton swab dipped into a pH 7.4 phosphate + diethyldithiocarbamate acid (DIECA) buffer.

Furthermore, young shoots of “Red Prestige” and “Freedom” plants that were PnMV positives by DAS-ELISA were grafted on three wild poinsettia plants obtained from stalks collected in Tehuiltepec, which were PnMV negative according to DAS-ELISA test. Each plant was cut obliquely; grafts were cut like a wedge shaped and inserted

Xilitla, y en 10 especies de plantas indicadoras (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. virginia*, *N. rustica*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa*). La fuente de inóculo se obtuvo de las plantas de nochebuena comercial “Red Prestige” y “Freedom” que presentaron la mayor concentración del virus según los resultados serológicos obtenidos. Brevemente, tres a cinco hojas jóvenes de las plantas se espolvorearon con carborundum de 600 mallas y se frotaron de manera independiente con un hisopo estéril previamente humedecido con el inóculo. Como control negativo se aplicó carborundum en la superficie de las hojas y se frotaron con un hisopo estéril humedecido con amortiguador de fosfatos + ácido dietilditiocarbámico (DIECA) pH. 7.4.

Adicionalmente, brotes tiernos de las variedades “Red Prestige” y “Freedom” que fueron positivos al PnMV con DAS-ELISA, se injertaron en tres plantas silvestres de nochebuena obtenidas a partir de las estacas recolectadas en Tehuilotepec y que fueron negativas al PnMV, según los resultados DAS-ELISA. A cada planta silvestre se le hicieron dos incisiones oblicuas; los injertos se cortaron en forma de cuña y se insertaron en las incisiones hechas en las plantas silvestres, de acuerdo con la metodología de Jayasinghe y Chuquillanqui (1992). Las plantas se mantuvieron en observación en un cubículo aislado del invernadero de virus de la UACH. Como control negativo se utilizaron dos plantas de nochebuena silvestre, una como injerto (brotes nuevos) y otra como portainjerto (plantas generadas a partir de las estacas recolectadas en Guerrero y San Luis Potosí).

Solamente en algunas de las plantas silvestres de nochebuena que se recolectaron en Jiutepec y en el invernadero de la UACH se observaron síntomas de moteado, deformación foliar, mosaico y manchas anulares (Figura 1). El moteado y la deformación de

into the cuts made on the wild poinsettia plants, according to Jayasinghe and Chuquillanqui (1992) methodology. Plants were kept under observation in the UACH virus greenhouse. Two wild poinsettia plants were used as negative control controls, one as a graft (young shoots) and another as a rootstock (plants developed from stalks collected in Guerrero and San Luis Potosí).

Only some of the wild poinsettia plants collected in Jiutepec and in the UACH greenhouse showed chlorosis, leaf deformation, mosaic and ring spots symptoms (Figure 1). Mottling and leaf deformation matched with symptoms induced by PnMV on poinsettia commercial plants grown in commercial nurseries in Venezuela (Carballo *et al.*, 2001) a New Zealand (Lebas *et al.*, 2007); however, the serological and molecular tests done in this research did not detect the virus. The 32 wild poinsettia plants were negative for the antiserum assessed. In general, the average absorbance of the leaf samples was 0.113 (Table 1); while root tissue assessed from the same plants collected in Tehuilotepec and Jiutepec, as well as one of the wild poinsettia plant from UACH green house, was 0.134 (Table 2). These results did not either match with those reported by Ocampo *et al.* (2013) in “nochebuena de sol” plants collected in Michoacán and Oaxaca, where the ELISA test showed that only 4 out of 28 plants with chlorosis, mosaic, variegation, leaf deformation and white spots symptoms were positive for PnMV. These symptoms, expressed after the plants were established at the INIFAP facilities (Zacatepec Experiment Field) from the twigs collected in the indicated sites, do not match with those induced by PnMV in commercial poinsettia plants, and they could be caused by insects. However, the fact that PnMV had been detected in the sap suggests that these samples became contaminated with the positive controls or that the infection caused by

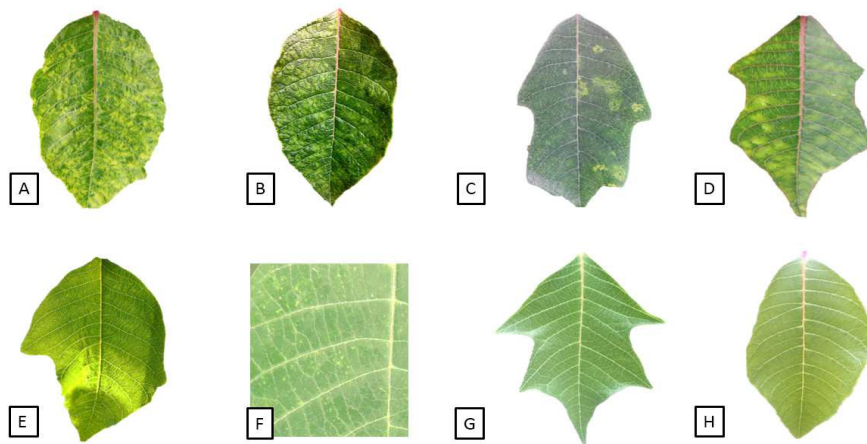


Figura 1. Hojas de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) con síntomas de posible origen viral. Hojas de plantas mantenidas en el invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo. Mosaico (A y B), manchas anulares (C) y moteado (D). Hojas de plantas recolectadas en Jiutepec, Morelos. Deformación (E) y puntos cloróticos (F). Hojas asintomáticas de plantas recolectadas en Tehuilotepec, Guerrero (G) y en Xilitla, San Luis Potosí (H).

Figure 1. Leaves of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*) showing possible viral symptoms. Plant leaves kept in Chapingo Autonomous University's greenhouse. Mosaic (A y B), ringspots (C) and mottling (D). Leaves of plants collected in Jiutepec, Morelos. Deformation (E) and chlorotic spots (F). Asymptomatic leaves of plants collected in Tehuilotepec, Guerrero (G) and in Xilitla, San Luis Potosí (H).

hojas coincide con los síntomas inducidos por el PnMV en plantas de nochebuena comercial producidas en viveros comerciales de Venezuela (Carballo *et al.*, 2001) y Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), pero los análisis serológico y molecular que se realizaron en la presente investigación no detectaron al virus. Las 32 plantas silvestres de nochebuena dieron reacción negativa al antisuero evaluado. En general, la absorbancia promedio de las muestras foliares fue de 0.113 (Cuadro 1); mientras que el tejido radical, que se evaluó de las mismas plantas recolectadas en Tehuilotepec y Jiutepec, y en una de las plantas silvestres de nochebuena del invernadero de la UACH, fue de 0.134 (Cuadro 2). Estos resultados tampoco concuerdan con lo reportado por Ocampo *et al.* (2013) en plantas de “nochebuena de sol” recolectadas en Michoacán y Oaxaca; en donde el análisis serológico por ELISA indicó que solamente 4 de 28 plantas con síntomas de clorosis, mosaico, variegado, deformación foliar

this virus is latent. If the infections are latent, it is possible that the symptomless wild poinsettia plants collected in Tehuilotepec, Jiutepec, and those developed from the twigs collected in Xilitla may provide a source of resistance to PnMV. However, as it was mentioned previously, in all these plants the DAS-ELISA test did not detect the virus, and the specific primers only amplified the expected band in the positive controls (“Freedom”). The 18S ribosomal primers retrotranscribed the expected RNA fragment that was isolated from the 32 wild poinsettia plants, showing a 99 % of similarity with the sequence recorded in the GenBank (EU326598.1) (data not shown). This suggests that the quality of the nucleic acid was good and that there were no reverse transcription inhibitors.

In improved poinsettia plants, PnMV cannot induce symptoms or it is able to cause foliar mottled, and leaf and bract distortion (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). The “Freedom” and “Red

Cuadro 1. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido foliar de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).

Table 1. Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for leaf tissue of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*).

| Número de planta | Sitio de muestreo | Repeticiones | | Promedio | Resultado |
|------------------|-----------------------|--------------|-------|--------------|-----------|
| | | I | II | | |
| 1 | Tehuilotepc | 0.109 | 0.109 | 0.109 | - |
| 2 | | 0.114 | 0.118 | 0.116 | - |
| 3 | | 0.119 | 0.126 | 0.123 | - |
| 4 | | 0.112 | 0.101 | 0.107 | - |
| 5 | | 0.109 | 0.104 | 0.107 | - |
| 6 | | 0.108 | 0.107 | 0.108 | - |
| 7 | | 0.120 | 0.110 | 0.115 | - |
| 8 | | 0.124 | 0.112 | 0.118 | - |
| 9 | | 0.192 | 0.190 | 0.191 | - |
| 1 | Jiutepec | 0.107 | 0.109 | 0.108 | - |
| 2 | | 0.102 | 0.117 | 0.110 | - |
| 3 | | 0.100 | 0.107 | 0.104 | - |
| 4 | | 0.101 | 0.111 | 0.106 | - |
| 5 | | 0.107 | 0.108 | 0.108 | - |
| 6 | | 0.105 | 0.117 | 0.111 | - |
| 7 | | 0.104 | 0.115 | 0.110 | - |
| 8 | | 0.114 | 0.107 | 0.111 | - |
| 9 | | 0.114 | 0.111 | 0.113 | - |
| 10 | | 0.115 | 0.114 | 0.115 | - |
| 1 | Xilitla | 0.114 | 0.118 | 0.116 | - |
| 2 | | 0.111 | 0.210 | 0.161 | - |
| 1 | UACH | 0.107 | 0.103 | 0.107 | - |
| 2 | | 0.102 | 0.104 | 0.102 | - |
| 3 | | 0.103 | 0.107 | 0.103 | - |
| 4 | | 0.101 | 0.103 | 0.101 | - |
| 5 | | 0.106 | 0.106 | 0.106 | - |
| 6 | | 0.106 | 0.280 | 0.106 | - |
| 7 | | 0.107 | 0.118 | 0.107 | - |
| 8 | | 0.104 | 0.107 | 0.104 | - |
| 9 | | 0.108 | 0.110 | 0.108 | - |
| 10 | | 0.116 | 0.116 | 0.116 | - |
| 11 | | 0.105 | 0.106 | 0.105 | - |
| Promedio | | | | 0.113 | |
| Control - | <i>N. benthamiana</i> | 0.113 | 0.108 | 0.110 | - |
| Control + | Agdia® | 1.280 | 1.232 | 1.256 | + |

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

y manchas blancas fueron positivas al PnMV. Estos síntomas, que se expresaron después de que las plantas se habían establecido en instalaciones del INIFAP (Campo Experimental Zacatepec) a partir de varetas recolectadas en las entidades señalizadas, no

Prestige” poinsettia used in this research showed mosaic and were positive for PnMV according to ELISA (Table 3) and RT-PCR results. In order to determine if the wild poinsettia plants were or not hosts for the virus, the foliar sap from “Freedom”

Cuadro 2. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido radical de plantas silvestres de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).**Table 2.** Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for root tissue of wild poinsettia plants (*Euphorbia pulcherrima*).

| Número de planta | Sitio de muestreo | Repeticiones | | Promedio | Resultado |
|------------------|-----------------------|--------------|-------|---------------|-----------|
| | | I | II | | |
| 1 | Tehuilotepic | 0.110 | 0.194 | 0.152 | - |
| 2 | | 0.102 | 0.106 | 0.104 | - |
| 3 | | 0.103 | 0.102 | 0.103 | - |
| 4 | | 0.193 | 0.187 | 0.190 | - |
| 5 | | 0.195 | 0.194 | 0.195 | - |
| 6 | | 0.128 | 0.190 | 0.159 | - |
| 7 | | 0.199 | 0.116 | 0.158 | - |
| 8 | | 0.194 | 0.150 | 0.172 | - |
| 9 | | 0.189 | 0.198 | 0.194 | - |
| 1 | Jiutepec | 0.107 | 0.105 | 0.106 | - |
| 2 | | 0.111 | 0.106 | 0.109 | - |
| 3 | | 0.106 | 0.114 | 0.110 | - |
| 4 | | 0.113 | 0.116 | 0.115 | - |
| 5 | | 0.103 | 0.117 | 0.110 | - |
| 6 | | 0.115 | 0.120 | 0.118 | - |
| 7 | | 0.109 | 0.118 | 0.114 | - |
| 8 | | 0.106 | 0.119 | 0.113 | - |
| 9 | | 0.111 | 0.112 | 0.112 | - |
| 10 | UACH | 0.116 | 0.116 | 0.116 | - |
| 11 | | 0.180 | 0.102 | 0.141 | - |
| Promedio | | | | 0.1345 | - |
| Control - | <i>N. benthamiana</i> | 0.113 | 0.108 | 0.1105 | - |
| Control + | Agdia® | 1.280 | 1.232 | 1.256 | + |

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

coinciden con los inducidos por el PnMV en plantas comerciales de nochebuena y pudieron haber sido causados por insectos. Sin embargo, el hecho de que en la savia se haya detectado al PnMV sugiere que pudo haber ocurrido contaminación con los controles positivos o que las infecciones causadas por este virus son latentes. En caso de que las infecciones sean latentes, es posible que las plantas silvestres de nochebuena asintomáticas que se recolectaron en Tehuilotepic, Jiutepec y aquellas que se desarrollaron a partir de varetas recolectadas en Xilitla puedan constituir una fuente de resistencia

plants that were PnMV positives by DAS-ELISA was mechanically inoculated on wild poinsettia leaves, but no symptoms were evident and the virus was not detected with the used techniques, nor it was defined if the grafts from the “Freedom” and “Red Prestige” varieties transmitted PnMV to the wild poinsettia plants because of graft abortion.

It is possible that the luminosity and temperature conditions during the transmission assays, that the biological features of the donor and recipient plants (phenological stage of development, nutrition) and/or that the characteristics of the buffer used

al PnMV, no obstante, como se indicó anteriormente, en todas estas plantas no se detectó al virus por DAS-ELISA y los iniciadores específicos solo amplificaron la banda esperada en los controles positivos (“Freedom”). Los iniciadores para el segmento del gen 18S ribosomal retrotranscribieron el fragmento esperado en el ARN que se aisló de las 32 plantas silvestres de nochebuena mostrando un 99 % de similaridad con la secuencia registrada en el Gen Bank (EU326598.1) (datos no mostrados), lo que indica que la calidad del ácido nucleico es buena y que no hubo inhibidores para la retrotranscripción.

En plantas mejoradas de nochebuena, el PnMV puede no inducir síntomas o bien causar moteado foliar y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). Las plantas comerciales de nochebuena “Freedom” y “Red Prestige” que se utilizaron en la presente investigación presentaron mosaicos y fueron positivas al PnMV según los resultados de ELISA (Cuadro 3) y RT-PCR. Para

to prepare the inoculum (associated with the virus stability and pathogenicity) have inhibited or prevented the mechanical and graft transmission of PnMV to wild poinsettias plants. However, it is also likely that the wild poinsettia are non-host plants for the virus, so they could be considered as a source of resistance to further development of Mexican varieties that can be integrated into an improvement genetic system to enhance their commercial features.

There was no transmission of PnMV to the indicator plants evaluated. *N. benthamiana*, which is one of the plants that has been infected with this virus (Lebas *et al.*, 2007), showed small necrotic spots (Figure 2 E) that rather than viral symptoms look like mechanical damages caused during inoculation; however, control treatment leaves did not develop these symptoms. *N. rustica*, *N. occidentalis* and *N. virginia* leaves developed chlorotic spots (Figure 2 A, C, G, I), but further serological and molecular tests did not detect the virus.

Cuadro 3. Absorbancia a 405 nm en la prueba DAS-ELISA de tejido foliar de dos variedades comerciales de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).

Table 3. Absorbance at 405 nm using DAS-ELISA for leaf tissue of two poinsettia commercial varieties (*Euphorbia pulcherrima*).

| Número de planta | Variedad | Repeticiones | | Promedio | Resultado |
|------------------|-----------------------|--------------|-------|--------------|-----------|
| | | I | II | | |
| 1 | “Freedom” | 1.160 | 1.160 | 1.160 | + |
| 2 | | 0.344 | 0.368 | 0.356 | + |
| 3 | | 0.534 | 0.628 | 0.581 | + |
| 4 | | 0.451 | 0.558 | 0.505 | + |
| 5 | | 0.446 | 0.450 | 0.448 | + |
| | Promedio | | | 0.610 | |
| 1 | “Red Prestige” | 0.246 | 0.234 | 0.240 | + |
| 2 | | 0.408 | 0.416 | 0.412 | + |
| 3 | | 0.235 | 0.221 | 0.228 | + |
| 4 | | 0.275 | 0.253 | 0.264 | + |
| | Promedio | | | 0.286 | |
| Control - | <i>N. benthamiana</i> | 0.113 | 0.108 | 0.110 | - |
| Control + | Agdia® | 1.280 | 1.232 | 1.256 | + |

Límite de detección (L. D.) = Promedio testigo negativo x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221 / Detection limit (L. D.) = Negative control average x 2 = 0.1105 x 2 = 0.221.

determinar si las plantas silvestres de nochebuena son o no hospedantes del virus, la savia de las hojas de la var. “Freedom”, en donde previamente se detectó al virus mediante DAS-ELISA, se inoculó mecánicamente en las hojas de plantas silvestres, pero no hubo expresión de síntomas y el virus no se detectó con las técnicas utilizadas. Tampoco se determinó si los injertos de las variedades “Freedom” y “Red Prestige” transmitieron al PnMV a las plantas de nochebuena silvestre debido a que los injertos abortaron.

Es posible que las condiciones de luminosidad y temperatura que se presentaron durante los ensayos de transmisión, que las características biológicas de la planta donante y receptora (etapa fenológica de desarrollo, nutrición) y/o que las características de los amortiguadores que se utilizaron para preparar el inóculo (relacionadas con la estabilidad e infectividad del virus) hayan inhibido o evitado la transmisión mecánica y por injerto del PnMV a plantas silvestres de nochebuena; sin embargo, también es probable que la nochebuena silvestre no sea hospedante de este virus, de tal manera que podría considerarse como fuente de resistencia para la generación de variedades mexicanas que puedan entrar a un sistema de mejoramiento genético que favorezca sus características comerciales.

No hubo transmisión del PnMV a las plantas indicadoras que se evaluaron. En *N. benthamiana*, que es una de las plantas en donde se ha logrado la transmisión del virus (Lebas *et al.*, 2007), se presentaron pequeños puntos necróticos (Figura 2 E), que más que un síntoma de origen viral pudiera tratarse de un daño mecánico generado durante la inoculación, aunque en las hojas del tratamiento testigo no se desarrollaron. En las hojas de *N. rustica*, *N. occidentalis* y en *N. virginia* hubo moteado clorótico (Figura 2 A,C,G, I), pero los análisis serológico y molecular no detectaron al virus.

In contrast with the results from wild poinsettia plants, the commercial plants were positive for PnMV, according to RT-PCR and DAS-ELISA results. The partial sequence of the virus was 92 % similar to the AB550791.1 sequence reported by GenBank (data not shown); and the plants had an average absorbance of 0.610 (“Freedom”) and 0.286 (“Red Prestige”), which were higher than the detection limit value (0.221) (Table 3). As previously stated, commercial poinsettia plants infected with this virus can be symptomless or develop chlorosis, and leaf and bract distortion (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). PnMV is a worldwide-spread pathogen. It has been reported in Australia (Spetz *et al.*, 2008), Korea (Chung *et al.* 2004), Denmark (Bech, 1996), New Zealand (Lebas *et al.*, 2007), Venezuela (Carballo *et al.*, 2001), among other countries. In Mexico, this is the first time that the virus is reported in the poinsettia commercial plants that were evaluated.

CONCLUSIONS

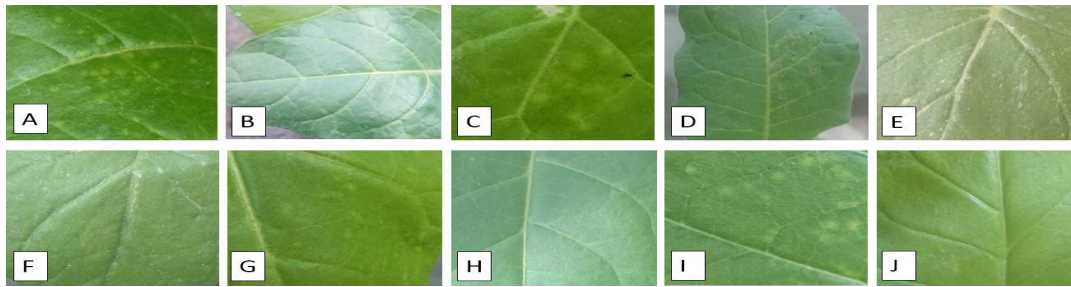
Wild poinsettia plants can be a source of resistance to PnMV. This is the first report in Mexico of PnMV in “Freedom” and “Red Prestige” commercial poinsettia varieties.

Acknowledgements

Thanks CONACyT and the Colegio de Postgraduados 167304 (2013)Trust for their financial support.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

En contraste con los resultados observados en las plantas de nochebuena silvestre, las plantas comerciales fueron positivas al PnMV según



**Figura 2.** Hojas de *N. rustica* (A y B), *N. occidentales* (C y D), *N. benthamiana* (E y F), *N. tabacum* cv. *Xanthi* (G y H) y *N. virginia* (I y J) a los 34 días después de haberse inoculado con el virus PnMV. En todas las plantas se desarrollaron moteados cloróticos, a excepción de *N. benthamiana* en donde se presentaron pequeños puntos necróticos. B, D, F, H y J corresponden a hojas de controles negativos.

**Figure 2.** Leaves of *N. rustica* (A y B), *N. occidentales* (C and D), *N. benthamiana* (E and F), *N. tabacum* cv. *Xanthi* (G y H) and *N. virginia* (I and J) 34 days after inoculation with PnMV. All plants developed chlorotic mottling, except for *N. benthamiana*, which showed small necrotic spots. B, D, F, H and J correspond to the negative control leaves.

los resultados de RT-PCR y DAS-ELISA. La secuencia parcial del virus fue 92 % similar con la secuencia AB550791.1 reportada en el GenBank (datos no mostrados); y las plantas tuvieron una absorbancia promedio de 0.610 (“Freedom”) y 0.286 (“Red Prestige”), superiores al límite de detección (0.221) (Cuadro 3). Como se indicó anteriormente, la nochebuena comercial infectada con este virus puede ser asintomática o desarrollar moteado y distorsión de hojas y brácteas (Carballo *et al.*, 2001; Lebas *et al.*, 2007). El PnMV es un patógeno cosmopolita; está reportado en Australia (Spetz *et al.*, 2008), en Corea (Chung *et al.* 2004), Dinamarca (Bech, 1996), Nueva Zelanda (Lebas *et al.*, 2007), Venezuela (Carballo *et al.*, 2001), entre otros países. En México, éste es el primer reporte del virus en las plantas comerciales de nochebuena que se evaluaron.

## CONCLUSIONES

Las plantas silvestres de nochebuena pueden ser una fuente de resistencia para el PnMV. Este es el primer reporte en México del PnMV en plantas

comerciales de nochebuena variedades “Freedom” y “Red Prestige”.

## Agradecimientos

Agradecemos al CONACyT y al Fideicomiso No. 167304 (2013) del Colegio de Postgraduados por el soporte financiero.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- aus dem Siepen M, Pohl JO, Koo BJ, Wege C and Jeske H. 2005. Poinsettia latent virus is not a cryptic virus, but a natural poleovirus-sobemovirus hybrid. *Virology* 336: 240-250.
- Bech K. 1996. Methods to eliminate Poinsettia mosaic virus in *Euphorbia pulcherrima* and reinfection by different methods to reveal the nature of the branching factor. *International Society for Horticultural Science (ISHS). Phytoparasitica* 24: 346.
- Canul KJ, García PF, Ramírez RS, Osuna CFJ. 2010. Programa de mejoramiento genético de nochebuena en Morelos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México. Publicación especial No. 49. 36 p.
- Canul KJ, García PF, Barrios GEJ, Osuna CFJ, Ramírez RS, Alia TI y Montoya CRE. 2014. Caracterización morfológica de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*

- 2:16-23.
- Carballo O, Izaguirre ML, and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* Infecting Poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease* 85: 1208.
- Colinas LMT, Mejía MJM, Espinoza FA, Alía TI, Martínez MF, Rodríguez EF y Flores EC. 2009. La Nochebuena de sol o de jardín. Folleto técnico. SNICS, SINAREFI, UACH. 15 p.
- Chung BN, Lee EK, Jeong MI and Kim HR. 2004. First Report of *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20: 220-223.
- Galindo GDB, Alía TI, Andrade RM, Colinas LMT, Canul KJ, Sainz AMJ. 2012. Producción de nochebuena de sol en Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 751-763.
- García ROG, Pérez ML, Navarro LMJ, Salas AMD, Martínez JOA, León GMF y Núñez PHG. 2014. Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. Nota científica. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 20: 147-156.
- Jayasinghe U y Chuquillanqui C. 1992. Uso de plantas indicadoras para la detección de virus en papa. *Guía de Investigación CIP21*. Lima, Perú. 30 p.
- Lebas BSM, Ochoa CFM, Elliott DR, Tang JZ and Alexander BJR. 2007. Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. in New Zealand. *Plant Disease* 91:110.
- Martins DR, Rodrigues SE, Pedroso J Arakava R, Rodrigues A, Lazarini B and Batista V. 2008. Detection and Identification of TMV infecting tomato under protected cultivation in Paraná state. *Brazilian archives of Biology and technology* 51:903-909.
- Ocampo OT. 2012. Identificación de virus asociados a la nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 47 p.
- Ocampo OT, Ochoa MDL, Ramírez RS, Valdovinos PG y Nava DC. 2013. Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 235-241.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo) (consulta, mayo 2015).
- SINAREFI. 2010. Red Nochebuena. Diagnóstico. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). SAGARPA. 124 p.
- Spetz C, Moe R and Blystad DR. 2008. Symptomless infectious cDNA clone of a Norwegian isolate of *Poinsettia mosaic virus*. *Archives of virology* 153: 1347-1351.
- Trejo L, Feria ATP, Olsen KM, Eguiarte LE, Arroyo B, Gruhn JA and Olson ME. 2012. Poinsettia's wild ancestor in the Mexican dry tropics: historical, genetic, and environmental evidence. *American Journal of Botany* 99: 1146-1157.
- USDA. 2104. Floriculture Crops 2013 Summary (June 2014). USDA, National Agricultural Statistics Service. 59 p.
- Zamboni A, Pierantoni L, De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *iForest* 1: 122.125.



# Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México

## Socioeconomic and parasitological factors that limits cocoa production in Chiapas, Mexico

**Elizabeth Hernández Gómez**, INIFAP Campo Experimental Rosario Izapa, Km. 18 Carretera Tapachula-Cacahoatan, Tuxtla Chico, Chiapas, México: 30870 (hernandez.elizabeth@inifap.gob.mx). **Javier Hernández Morales**, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Instituto de Fitosanidad. km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, México: 56230 (jhernandez@colpos.mx). **Carlos Hugo Avendaño Arrazate**, INIFAP Campo Experimental Rosario Izapa, Km. 18 Carretera Tapachula-Cacahoatan, Tuxtla Chico, Chiapas, México: 30870 (vendano.carlos@inifap.gob.mx). **Guillermo López Guillen**, INIFAP Campo Experimental Rosario Izapa, Km. 18 Carretera Tapachula-Cacahoatan, Tuxtla Chico, Chiapas, México: 30870 (lopez.guillermo@inifap.gob.mx). **Eduardo Raymundo Garrido Ramírez**, INIFAP Campo Experimental Centro de Chiapas, Km. 3 Carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, México: 29140. (garrido.eduardo@inifap.gob.mx). **Jesús Romero Nápoles**, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Instituto de Fitosanidad. km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, México: 56230 (jnapoles@colpos.mx). **\*Cristian Nava Díaz**, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Instituto de Fitosanidad. km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, México: 56230. \*Correspondencia: nava@colpos.mx.

**Recibido:** Junio 11, 2015.

**Aceptado:** Julio 07, 2015.

Hernández-Gómez E, Hernández-Morales J, Avendaño-Arrazate CH, López-Guillen G, Garrido-Ramírez ER, Romero-Nápoles J y Nava-Díaz C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 232-246.

**Resumen.** El objetivo de la investigación fue identificar los factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. Se llevaron a cabo encuestas y visitas a 109 productores de las dos principales regiones productoras. Entre los resultados más importantes se registró que solamente el 14.7 % de los productores cultiva cacao de almendra blanca. La unidad de producción promedio es de 2.6 ha. Los productores tienen una edad promedio de 59 años y el 56 % de ellos no completó su instrucción

**Abstract.** The main goal of this research was to identify the socioeconomic and parasitological factors that limit cocoa production in Chiapas, Mexico. One hundred and nine cacao-growers were visited and interviewed in the two main cocoa-producing regions. According to results only 14.7 % farmers grow white-almond cacao. The average production unit is 2.6 hectares. Cacao growers are 59 years-old on average and 56 % of them did not finish elementary school. Only 19.3 % of the production units are under woman responsibility. Average yield is 118 kg ha<sup>-1</sup> and 60.5 % growers sell cacao to intermediaries. Pests that affect the crop and their occurrence include *Moniliophthora roreri* (100 %), *Phytophthora capsici* (67%), *Fusarium* sp. (10.1 %), *Colletotrichum gloeosporioides* (3.7%), *Ceratocystis cacaofunesta* (0.9 %), *Atta* sp. (33.9 %), *Toxoptera aurantii* (11 %), squirrels (7.3 %), *Xyleborus ferrugineus*,

primaria. Sólo el 19.3 % de las unidades productivas está bajo la responsabilidad de mujeres. El rendimiento promedio es de 118 kg ha<sup>-1</sup> y el 60.5 % de los productores vende el cacao a intermediarios. Las plagas que afectan al cultivo y su frecuencia son: *Moniliophthora roreri* (100 %), *Phytophthora capsici* (67 %), *Fusarium* sp. (10.1 %), *Colletotrichum gloeosporioides* (3.7 %), *Ceratocystis cacaofunesta* (0.9 %), *Atta* sp. (33.9 %), *Toxoptera aurantii* (11 %), ardillas (7.3 %), *Xyleborus ferrugineus*, *Xylosandrus morigerus*, *Hypothenemus birmanus*, *Corthylus minutissimus*, *Taurodermus sharpi*, *Hypothenemus interstitialis* (5.5 %), *Vanduzee segmentata* (5.5 %), pájaro carpintero (4.6 %), *Selenothrips rubrocinctus* (3.7 %), *Clastoptera laenata* (3.7 %) y tuzas (3.7 %). *Moniliophthora* es el principal factor que afecta la supervivencia del cacao y su biodiversidad en Chiapas. Esta enfermedad destruye la producción, hace su control no rentable e induce a los agricultores a abandonar sus huertas.

**Palabras clave:** México, Cacao, Decadencia, Socioeconómicos, Plagas.

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L), originario de América del Sur, es un cultivo de importancia económica, industrial, social, cultural y ambiental (Motamayor *et al.* 2002). En los últimos 10 años, en México, se ha observado una tendencia decreciente en la producción. En el 2003 se reportó una producción de 49,964 ton mientras que para 2013 la producción fue de sólo 27 844 ton, con una reducción en la superficie cultivada de 20 668 ha. Chiapas es uno de los estados productores más importantes de cacao, ocupa el segundo lugar en producción después de Tabasco quien posee una su-

*Xylosandrus morigerus*, *Hypothenemus birmanus*, *Corthylus minutissimus*, *Taurodermus sharpi*, *Hypothenemus interstitialis* (5.5 %), *Vanduzee segmentata* (5.5 %), woodpecker (4.6 %), *Selenothrips rubrocinctus* (3.7 %), *Clastoptera laenata* (3.7 %) and mole (3.7 %). *Moniliophthora* is the main factor that affects cacao survival and biodiversity in Chiapas. The disease destroys production, makes control uneconomical and causes growers to abandon their plantations.

**Keywords:** Mexico, cacao, decline, socioeconomic, pests.

## INTRODUCTION

Cacao (*Theobroma cacao* L), originally from South America, is a crop of economic, industrial, social, cultural and environmental importance (Motamayor *et al.* 2002). In Mexico, a decreasing trend in cacao production has been observed in the past decade. Production in 2003 was 49,964 tons, while production in 2013 was only 27,844 tons, and with the growing area decrease by 20,668 hectares (ha). Chiapas is one of the most important cocoa-growing states, ranked second in production following Tabasco, whose area sown to cacao is 20,299 ha, and harvests 9,080 ton at a rate of 440 kg ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2014). The major cacao growing areas of Chiapas are Soconusco and northern Chiapas (SIAP, 2014), where cacao has been part of the state's culture, economy, society and history (Nájera, 2012).

A recent effort led by Avendaño *et al.* (2013) has shown the economic, social, cultural and environmental value of cacao plantations. The effort known as "Participative improvement" (Aguirre, 2009; Avendaño *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2013) recognizes cacao as a source of diversity

perficie destinada al cultivo de 20,299 ha y produce 9,080 ton a razón de 440 kg ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2014). Las principales zonas productoras de cacao en Chiapas son el Soconusco y Norte del estado (SIAP, 2014) donde este cultivo ha sido parte de la cultura, economía, sociedad e historia (Nájera, 2012).

Una iniciativa reciente liderada por Avendaño *et al.* (2013) ha mostrado el valor económico, social, cultural y ambiental de las plantaciones de cacao. Esta iniciativa denominada “Mejoramiento Participativo” (Aguirre, 2009; Avendaño *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2013) reconoce al cacao como fuente de diversidad y selecciona los mejores ejemplares en términos de resistencia a enfermedades y propiedades organolépticas excepcionales con potencial comercial sobresaliente.

Desafortunadamente, el cacao enfrenta una crisis debida a factores ambientales, tecnológicos, económicos y sociales, que se ven agravados por problemas fitosanitarios como las enfermedades que destruyen plantaciones enteras, obligando a los productores a abandonar este cultivo ancestral (González, 2005). En México no se han identificado los factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción de una manera puntual y precisa y todo apunta a que las enfermedades contribuyen de manera significativa a la desaparición de este importante cultivo, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar los factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Zona de estudio.** Durante 2013, se aplicaron encuestas y visitaron 109 productores de cacao en 45 localidades en ocho municipios de las dos principales regiones productoras de cacao en Chiapas: Soconusco y Norte. En la Región Soconusco se

and selects the best plants in terms of disease resistance and outstanding organoleptic properties and outstanding marketing potential.

Unfortunately, cacao production faces a crisis sparked by environmental, technological, economic and social factors, which is worsened by phytosanitary problems, including diseases that destroy entire plantations and force growers to leave behind this ancestral crop (González, 2005). In Mexico, no socioeconomic and parasitological factors that specifically limit production have been identified, and everything indicates that diseases are contributing significantly to the disappearance of this important crop. Thus the objective of this study was to identify the socioeconomic and parasitological factors that limit cacao production in Chiapas, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

**Study area.** In 2013 a series of surveys was undertaken which included visits to 109 cacao growers from 45 locations in eight municipalities from the two major cacao growing-regions in Chiapas: Soconusco and northern Chiapas. In the Soconusco region 32 surveys were conducted in the municipalities of Cacahoatán, Huehuetán, Tapachula, Tuxtla Chico and Tuzantán. In the northern region 13 surveys were conducted in the municipalities of Ostucán, Pichucalco and Ixtacomitán.

**Sample size.** For the selection of participant growers and growers visited, a random selection method without replacement was used based on SAGARPAS' 2013 cacao growers census. In cacao plots a five diamond pattern was used to estimate the presence of pests.

realizaron 32 encuestas en los municipios de Cahacoatán, Huehuetán, Tapachula, Tuxtla Chico y Tuzantán. En la Región Norte se realizaron 13 encuestas en los municipios de Ostucán, Pichucalco e Ixtacomitán.

**Tamaño de muestra.** Para seleccionar a los productores encuestados y visitados se utilizó un método de selección aleatorio sin remplazo sobre el padrón de productores de cacao publicado por SAGARPA en 2013. En las parcelas de cacao se utilizó el esquema en 5 de oros para estimar la presencia de las plagas.

**Encuesta y cálculo de frecuencias.** La encuesta se diseñó de acuerdo a lo reportado por Ghiglione y Matalón (1989), Córdova *et al.* (2001), Díaz, *et al.* (2013) y Quispe (2013), y estaba integrada por ocho apartados con 62 reactivos: 1. Ficha de identificación (nombre del productor, comunidad y fecha); 2. Datos generales (edad, sexo, escolaridad, tenencia de la tierra y actividades económicas, financiamiento, capacitación, organización, mano de obra); 3. Datos de la parcela (superficie, tipo de cacao, marco de plantación, árboles de sombra); 4. Manejo agronómico (control de maleza, fertilización, drenaje); 5. Plagas (plagas observadas, importancia, control); 6. Enfermedades (enfermedades observadas, importancia, control); 7. Producción y comercialización (beneficiado, precio, producción y comercialización) y 8. Expectativas (continuación con el cultivo). Las respuestas de los entrevistados fueron capturadas y las frecuencias determinadas mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Versión 20).

**Identificación de problemas parasitológicos.** Durante las visitas a las parcelas seleccionadas se colectaron insectos y muestras de plantas con síntomas de enfermedades para su identificación y

**Survey and occurrence calculations.** The survey was designed according to Ghiglione and Matalón (1989), Córdova *et al.* (2001), Díaz, *et al.* (2013) and Quispe (2013) reports, and included eight sections with 62 questions: 1. Identification card (producer's name, community and date); 2. General information (age, gender, education, landholding and economic activities, funding, training, organization, labor); 3. Plot information (area, type of cacao, planting distance, shade trees); 4. Agronomic management (weed control, fertilization, drainage); 5. Pests (observed pests, importance, control); 6. Diseases (observed diseases, importance, control); 7. Production and marketing of the cocoa processing, price, (production and marketing); and 8. Expectations (continue planting cacao). Responses from farmers interviewed were collected and occurrences defined using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Version 20).

**Identification of parasitological problems.** During visits to the selected plots, insects and samples of plants showing disease symptoms were collected for identification and diagnosis purposes, respectively. Insects were kept in alcohol at 70 %. Then, they were mounted on entomological pins and identified at species level using taxonomic keys. A second opinion from an insect taxonomy expert was requested for each insect. For diseases, samples of plants showing symptoms were placed in a moisture chamber for 48 hours. If after this period, structures of the causing agent were present, they were identified according to their taxonomic group. Otherwise, cuts were made to the diseased tissue, which was disinfected with sodium hypochlorite (1.5 %) for three minutes, washed three times in autoclaved distilled water, dried, and finally planted in a PDA growth medium. The resulting isolations were purified using the hyphal

diagnóstico, respectivamente. Los insectos fueron conservados en alcohol al 70 %. Posteriormente fueron montados en alfileres entomológicos e identificados a nivel especie utilizando claves taxonómicas. Una segunda opinión de un experto en taxonomía de insectos fue solicitada para cada ejemplar. Para el caso de las enfermedades, las muestras de plantas con síntomas se colocaron en una cámara húmeda por 48 horas. Si después de este lapso de tiempo se encontraron las estructuras del agente causal, éstas fueron identificadas de acuerdo al grupo taxonómico. De otra manera, se realizaron cortes del tejido enfermo que fue desinfectado en hipoclorito de sodio (1.5 %) durante tres minutos y lavado tres veces en agua destilada estéril y secado para finalmente sembrarlo en medio de cultivo PDA. Los aislamientos obtenidos fueron purificados por la técnica de punta de hifa e incubados bajo 12 horas de luz blanca hasta su esporulación. En todos los casos se llevó a cabo la extracción de ácidos nucleicos (Qiagen, USA) para la identificación molecular de los organismos (BLAST NCBI) mediante la amplificación de la región del ITS utilizando los primers ITS4 e ITS5 y el protocolo de White *et al.* (1990).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aspectos socioeconómicos.** En Chiapas la actividad cacaotera la realizan pequeños productores. El 58.7 % tiene parcelas de cacao menores a dos hectáreas y el 41.3 % tiene parcelas de mayor superficie. El promedio de edad de los productores fue de 59 años. El 80.7 % de los productores de cacao son del género masculino y solamente el 19.3 % son del género femenino, que además de ser productoras, realizan las labores del hogar y el cuidado de los hijos, por lo que triplican sus jornadas de trabajo como lo mencionan Suárez *et al.* (2011). Las

tip technique and incubated under 12 hours of white light until sporulation. In all cases, nucleic acids were extracted (Qiagen, USA) for molecular identification of organisms (BLAST NCBI); this was achieved by amplifying the ITS region with primers ITS4 e ITS5 and the protocol of White *et al.* (1990).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Economic aspects.** In Chiapas, cacao production is a smallholder activity. 58.7 % smallholders own plots of less than two hectares and 41.3 % hold larger plots. The average age of growers is 59 years old. 80.7 % cacao growers are male and only 19.3 % are female. Women are also responsible for household chores and childcare, thus tripling their workload, according to Suárez *et al.* (2011). Women are engaged in activities such as harvest, washing, fermentation and drying, but women's contribution is not considered significant to the production process, belittling their important participation in the cacao production process. This male behavior has also been observed in other crops (Maier, 1998; Agarwal, 1992; Cortez and Pizarro, 2001).

Education. More than 50 % cacao growers did not finish elementary education, and only 4.6 % hold a B.S. degree (Table 1). Engler and Toledo (2010) suggested that the low level of education affects negatively the adoption rates of technology innovations. This study found that only 53.2 % cacao growers had requested and received technical training.

Legal status of plots. 67 % of the production units are ejidos and the remainder are private property. In Mexico, the ejido is the most important form of collective land ownership, which is ruled by an internal regulation that sets forth the terms for

mujeres participan en actividades como la cosecha, lavado, fermentación y secado, pero no son consideradas como un apoyo significativo en el proceso de producción, denigrando con ello su importante participación en el proceso productivo del cacao. Este comportamiento masculino ya ha sido observado en otros cultivos (Maier, 1998; Agarwal, 1992; Cortez y Pizarro, 2001).

**Escolaridad.** Más de la mitad de los productores no completó su instrucción primaria y sólo el 4.6 % concluyó una licenciatura (Cuadro 1). Engler y Toledo (2010) indicaron que el bajo nivel educativo repercute negativamente en las tasas de adopción de innovaciones tecnológicas. En este estudio se detectó que sólo el 53.2 % de los productores han buscado y recibido capacitación técnica.

**Situación legal de las parcelas.** El 67 % de las unidades de producción son ejidales y el resto propiedad privada. En México, el ejido es la forma más importante de posesión colectiva de la tierra, el cual opera con un reglamento interno que contiene las bases para su organización económica y social (Legislación Agraria, 2004). Esto implica que las parcelas destinadas al cultivo de cacao estén sujetas a un limitado comercio, por ejemplo el 66.1 % de las unidades de producción han sido heredadas y sólo el 34 % han sido adquiridas.

Los agricultores de cacao comienzan a diversificar sus actividades económicas para cubrir sus necesidades de ingresos. Por ejemplo, el 16.5 % de los productores lleva a cabo comercio, servicios y tiene otros cultivos. El 68.8 % de los productores realiza las actividades culturales del cacao con recursos propios y el 31.2 % ha recibido algún apoyo financiero.

**Organización.** El 60.6 % de los productores de cacao pertenece a una asociación para acceder fácilmente a los recursos financieros y de capacitación que ofrece el gobierno. Las principales asociaciones

its economic and social organization (Legislación Agraria, 2004). This means that plots for cacao production are subject to limited marketing; for example, 66.1 % of the production units were inherited and only 34 % were purchased.

Cacao growers have started to diversify their economic activities to fulfill their income needs. For example, 16.5 % of them are traders, service suppliers and grow other crops. 68.8 % cultivate cacao with their own resources, and 31.2 % of them have received some financial support.

**Organization.** 60.6 % cacao growers belong to an association that facilitates their access to the financial and training resources offered by the government. The main cacao growers associations in the state of Chiapas are Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tapachula (Tapachula Local Agricultural Association of Cacao Growers); Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tuxtla Chico (Tuxtla Chico Local Agricultural Association of Cacao Growers); Sociedad de Producción Rural Cuevas de Tigre de Pichucalco (Pichucalco Tiger Caves Rural Production Society); Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tuzantán (Tuzantán Local Agricultural Association of Cacao Growers); and Alianza del Cacao de Tuxtla Chico (Tuxtla Chico

**Cuadro 1.** Escolaridad de productores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Región Soconusco y Región Norte de Chiapas, México.

**Table 1.** Level of education of cacao growers (*Theobroma cacao* L.) in the Soconusco and northern Chiapas regions.

| Escolaridad         | Frecuencia relativa (%) |
|---------------------|-------------------------|
| Ninguno             | 20.2                    |
| Primaria incompleta | 35.8                    |
| Primaria completa   | 16.5                    |
| Secundaria          | 18.3                    |
| Bachillerato        | 4.6                     |
| Licenciatura        | 4.6                     |

de agricultores de cacao en el estado de Chiapas son: Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tapachula, Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tuxtla Chico, Sociedad de Producción Rural Cuevas de Tigre de Pichucalco, Asociación Agrícola Local de Productores de Cacao de Tuzantán y la Cooperativa Alianza del Cacao de Tuxtla Chico. De las asociaciones agrícolas, el 51.1 % son municipales, y el 43.4 % se encuentra distribuido en 11 diferentes figuras asociativas. Las asociaciones no operan en el acopio y comercialización del cacao (con excepción de la Asociación de Productores de Cacao de Tuxtla Chico), por lo que es recomendable fortalecer los procesos de organización en busca de obtener mayor producción, valor agregado al producto y mejores ingresos para los socios.

**Mano de obra.** El 54.1 % de los productores utiliza jornales en al menos una de las siguientes actividades durante el ciclo agrícola de cacao: limpia, poda y regulación de sombra. La participación de la familia en las actividades del cacao es igual de importante, pues el resto de los productores (45.9 %) realiza estas actividades con mano de obra familiar.

**Aspectos agronómicos.** Más del 50 % de las parcelas se encuentran en regiones planas lo que facilita las actividades del cultivo, los suelos son más profundos, fértiles y se erosionan menos. El otro 50 % de las parcelas se encuentra en ladera, que se consideran marginales, menos productivas y con acceso a tecnología y comunicación más difícil.

En Chiapas se cultivan diferentes tipos de cacao conocidos comúnmente como Calabacillo (también llamado Ceylan o Costa Rica), Guayaquil, Injerto (RIM), Lagarto, Tabasco, que se les denominan de almendra blanca (criollo). El 14.7 % de los productores en Chiapas cultivan cacao de almendra blanca; este bajo porcentaje es debido a que este tipo de cacao presenta mayor susceptibilidad a enfermedada-

Cococa Cooperative Alliance). From these, 51.1 % are municipal and 43.4 % are divided in 11 different agricultural associations. Associations are not engaged in cacao collection and marketing (except for the Tuxtla Chico Cacao Growers Association). For this reason we recommend strengthening the organizational procedures in order to increase production, add higher value to products and increase partners' income.

**Labor.** 54.1 % cacao growers use labor in at least one of the following activities during the cacao crop cycle: cleansing, pruning and shade regulation. Engagement of the family in cacao activities is also important, since the rest of the farmers (45.9 %) carry out these activities using family labor.

**Agronomic aspects.** Over 50 % cocoa plots are in plain regions, which facilitates crop activities because soils are deeper, fertile and less eroded. The other 50 % plots are on hills, and these are considered marginal, less productive and with poor access to technology and communication.

In Chiapas different types of cacao are grown, such as Calabacillo (also called Ceylán or Costa Rica), Guayaquil, Injerto (RIM), Lagarto, Tabasco, also known as white almond landraces. 14.7 % growers in Chiapas harvest white almond cacao. This percentage results from a higher level of susceptibility to diseases. Accordingly, Córdova (2005) pointed out that one of the main constraints to cacao production and conservation are diseases. On the other hand, Ramírez (1997) mentions the importance of these cacaos, since they are the basis for genetic improvement of ordinary cacaos (foreigner).

Cacao plantations in Chiapas are 36 years old on average. Avendaño *et al.* (2011) found similar data in his research and reports that plantations are over 25 years old and only 4 % farmers hold new plantations. According to León (1987), a

des. En concordancia, Córdova (2005) señaló que una de las principales limitantes para la producción y conservación de cacao son las enfermedades. Por otro lado, Ramírez (1997) menciona la importancia de estos cacaos ya que son la base del mejoramiento genético de los cacaos ordinarios (forasteros).

Las plantaciones de cacao en Chiapas tienen un promedio de 36 años de edad. Avendaño *et al.* (2011) encontró datos similares en su investigación y reporta que las plantaciones tienen más de 25 años y sólo el 4 % de los productores tiene plantaciones nuevas. De acuerdo con León (1987), una plantación de cacao puede mantenerse productiva de 25 a 30 años. La edad de las actuales plantaciones de cacao indudablemente es una de las razones que contribuye a la decadencia del cultivo por lo que es urgente renovar las plantaciones en un marco de plantación de 4x4 m. La sombra es necesaria para el cultivo del cacao, ésta puede variar de acuerdo con las especies y genotipos usados, así como de las características del ambiente. En Chiapas, los productores utilizan árboles maderables, frutales y nativos de la región (Cuadro 2). La sombra juega un papel importante como amortiguador de las condiciones climáticas adversas (Beer, 1988; Roa *et al.* 2009; Salgado *et al.* 2007), como fuente de alimentos e ingresos, como espacio para la conservación y manejo de la biodiversidad y en la captura de carbono y filtración de agua (Beer, 1988; Parrish *et al.*, 1999).

Sólo el 38 % de los productores utilizan árboles de sombra y la regulan. El bajo porcentaje de productores que destinan recursos a mantener y regular sombra dentro del cacaotal se explica al considerar que la mayor parte de ellos considera que es una actividad que aporta pocos beneficios al cacao, implica un costo de producción y no resulta redituable.

La mayoría de los productores (97.2 %) efectúa al menos un chapeo manual para eliminar malas

cacao plantation can be productive for as long as 25-30 years. There is no doubt that the age of the current cacao plantations is one of the reasons contributing to the decline of the crop, so it is urgent to renew plantations using a 4x4 m planting framework. Cacao crop needs shade and this may vary according to species and genotypes used and environment characteristics. In Chiapas, cocoa growers use timber, fruit and native trees (Table 2). Shade plays an important role as a buffer against weather conditions (Beer, 1988; Roa *et al.* 2009; Salgado *et al.* 2007), as well as a source for food and income, space for biodiversity conservation and management, carbon capture and water infiltration (Beer, 1988; Parrish *et al.*, 1999).

Only 38 % cocoa growers use shade trees and regulate the shade. The low percentage of growers who allocate resources to maintaining and regulating shade within their cacao plantations is explained by the fact that most of them believe that shading is of little benefit to the crop, which generates production costs and is not profitable.

Most cacao growers (97.2%) weed manually to remove weeds from their plantations. This task is achieved during the rainy season because it is at that time when weeds tend to grow and affect the crop.

Only 32 % of the interviewed growers apply chemical fertilizer, for which they use urea (46-00-00); 4.6 % uses compost. Composts are made of plant residues from pruning, shade trees canopy and the skin of the fruit harvested.

Though 50 % of the plots are in flatlands, only 15.6 % growers said that they drain their plots to remove the excess of water accumulated during the rainy season and thus prevent disease outbreaks (Moore-Landeker, 1996).

The current average yield of cacao in Chiapas is 118 kilograms per hectare and ranges from 0 kg ha<sup>-1</sup> to 800 kg ha<sup>-1</sup>. Cocoa is harvested throughout



**Cuadro 2.** Especies de árboles de sombra utilizados en cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Región Soconusco y Región Norte de Chiapas, México.

**Table 2.** Species of shade trees used in cacao (*Theobroma cacao* L.) plantations in the Soconusco and northern Chiapas, Mexico, regions.

| Nombre científico                                 | Nombre común    | Uso                         |
|---------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <i>Artocarpus communis</i> Forst                  | Pan de palo     | Maderable                   |
| <i>Aspidosperma megalocarpum</i> L.               | Chiche          | Maderable                   |
| <i>Castilla elastica</i> Sessé ex Cerv.           | Hule            | Industriales                |
| <i>Cedrela odorata</i> L.                         | Cedro           | Maderable                   |
| <i>Chrysophyllum caimito</i> L.                   | Caimito         | Frutal y Maderable          |
| <i>Citrus sinensis</i> L.                         | Naranja         | Frutal                      |
| <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz y Pav.) Oken (1833) | Laurel          | Maderable                   |
| <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.                    | Palma de aceite | Industriales                |
| <i>Garcinia mangostana</i> L.                     | Mangostán       | Frutal                      |
| <i>Inga micheliana</i> Harms                      | Chalum          | Frutal fijador de nitrógeno |
| <i>Mangifera indica</i> L.                        | Mango           | Frutal                      |
| <i>Musa</i> sp.                                   | Banano          | Frutal                      |
| <i>Nephelium lappaceum</i> L.                     | Rambután        | Frutal                      |
| <i>Persea americana</i> Mill.                     | Aguacate        | Frutal                      |
| <i>Piper</i> sp.                                  | Pimienta        | Industriales                |
| <i>Pouteria sapota</i> (Jacq.) H.E.Moore y Stearn | Sapote          | Frutal                      |
| <i>Tabebuia donnell-smithii</i> Rose              | Primavera       | Maderable                   |
| <i>Tabebuia pentaphylla</i> L.                    | Roble           | Maderable                   |

hierbas en el cacaotal; esta actividad se realiza durante el periodo de lluvias, debido a que las malas hierbas tienden a crecer y afectar el cacao en esta época.

Sólo el 32 % de los entrevistados realiza fertilización química, para lo cual utilizan urea (46-00-00); el 4.6 % utiliza composta para la fertilización. Esta composta es elaborada a base de desechos vegetales producto de las podas del cacao, de árboles de sombra y cáscara de los frutos cosechados.

A pesar de que el 50 % de las parcelas se encuentran en planicies, sólo el 15.6 % de los productores señaló que realiza drenaje en sus parcelas con el fin de desalojar el agua excedente que se acumula durante el periodo de lluvias, y así evitar condiciones apropiadas para el desarrollo de enfermedades (Moore-Landeker, 1996).

El rendimiento promedio actual del cacao en Chiapas es de 118 kilogramos por hectárea y oscila

the year. However, most of the harvest takes place in June, October and November.

Profit is essential and decisive to harvest beans of good quality (it provides the basic principles of taste and scent) and for farmers to make a profit from its marketing in national and international markets. Cocoa processing includes fermentation, washing and drying (Table 3). The fermentation process is traditionally carried out by placing the cocoa beans in wooden boxes under controlled conditions.

Marketing. 76.1 % cocoa growers sell their harvest as dried beans after processing, while 20.2 % sell their production as mucilaginous pulp (Table 3). Selling fresh cacao is a fast way to market their produce to intermediaries without having to process it.

Cacao can be marketed through different means. 60.5 % growers sell their produce to intermediaries,

de 0 kg ha<sup>-1</sup> a 800 kg ha<sup>-1</sup>. La cosecha de cacao se realiza durante todo el año, no obstante, la mayor producción de la cosecha se acentúa en los meses de junio, octubre y noviembre.

El beneficio es una parte esencial y determinante para obtener buena calidad de grano (proporciona los principios básicos de sabor y aroma) y acceder a ganancias durante la comercialización en el mercado nacional e internacional. El beneficiado incluye la fermentación, lavado y secado (Cuadro 3). El proceso de fermentación se realiza tradicionalmente al depositar el grano en cajones de madera bajo condiciones controladas.

Comercialización. El 76.1 % de los productores comercializó su cosecha como grano de cacao seco después del proceso de beneficiado, mientras que el 20.2 % lo hizo como cacao en baba (Cuadro 3). La venta de cacao en fresco representa una forma rápida de vender su producto a intermediarios sin tener que beneficiarlo.

La comercialización del cacao puede realizarse por diferentes medios. El 60.5 % de los productores venden su cacao a un intermediario, el 33 % lo comercializan con las asociaciones y sólo el 2.8 % vende su cacao directamente al consumidor en forma de chocolate artesanal, obteniendo con ello mayores ganancias. Sólo el 3.7 % declaró no haber cosechado. El precio por kilogramo de grano de cacao seco

33 % through associations, and only 2.8 % sell their cacao directly to end consumers as artisanal chocolate, for which they make greater profits. Only 3.7 % reported not having harvest. The price per kilogram of dry cacao beans during 2013-2014 was \$30.00 pesos. According to 55 % growers, this price is lower than that they were paid in the previous cycle. This fact shows that price is another factor contributing to the decline of the crop.

**Parasitological aspects.** Diseases are the main parasitological problem that limits cacao production for they cause losses of up to 100 %, if there is no control. According to the visits and interviews conducted, moniliasis was found in 100 % plots; moniliasis is a fungal infection caused by *Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.* The disease is considered a serious threat to the cocoa crop in Mexico (Phillips, 2004; Phillips *et al.*, 2006; Ramírez, 2008); in 67 % plots black spots on pods, caused by *Phytophthora capsici* Leonian, were observed; in 10.1 % plots branch galls were detected, which are associated to *Fusarium* sp. This is a potentially important disease worldwide (Ploetz, 2007); 3.7 % showed anthracnose symptoms on leaves and fruits; this disease is associated to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz; in 0.9 % of the plots wilt of cacao was detected, which is

**Cuadro 3.** Proceso de beneficiado de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Región Soconusco y Región Norte de Chiapas, México.

**Table 3.** Processing of cacao beans production (*Theobroma cacao* L.) in the Soconusco and northern Chiapas, Mexico, regions.

| Beneficiado                       | Frecuencia Relativa (%) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Fermentación en cajones de madera | 3.7                     |
| Lavado y secado                   | 54.1                    |
| Fermentación en bolsas            | 12.8                    |
| Secado directo después de corte   | 5.5                     |
| En baba (sin beneficiado)         | 20.2                    |
| Sin cosecha                       | 3.7                     |

durante 2013-2014 fue de \$30.00 pesos. De acuerdo al 55% de los productores, este precio es menor al que les fue pagado en el ciclo anterior, con ello se pone de manifiesto que el precio de cacao es otro factor que está contribuyendo a la decadencia del cultivo.

**Aspectos parasitológicos.** Las enfermedades son el principal problema parasitológico que limita la producción del cacao, ya que pueden ocasionar pérdidas hasta del 100 %, si no existe control alguno. De acuerdo a las visitas y entrevistas: 100 % de las parcelas presentaban moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.* Esta enfermedad es considerada como una seria amenaza para el cultivo en México (Phillips, 2004; Phillips *et al.*, 2006; Ramírez, 2008); en el 67 % de las parcelas se presentó la mancha negra de la mazorca, ocasionada por *Phytophthora capsici* Leonian; en el 10.1 % de las parcelas se detectaron agallas de ramas, las cuales están asociadas a *Fusarium* sp., ésta es una enfermedad potencialmente importante en todo el mundo (Ploetz, 2007); en el 3.7 % de las parcelas se presentó la antracnosis en hojas y frutos, que está asociada a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz; en el 0.9 % de las parcelas se detectó el mal de machete causado por el hongo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & T.C. Harr. que estuvo asociada a insectos barrenadores.

Nuestros resultados permiten identificar a la moniliasis como el principal factor parasitológico que ha influido en la pérdida de producción y biodiversidad del cacao en Chiapas, ya que al destruir la producción facilita que el agricultor pierda el interés y abandone su campo de cultivo o lo reemplace con otro frutal, además de hacer que el cultivo de cacao sea poco rentable por el costo de las aplicaciones y medidas de control necesarias para contener la enfermedad.

caused by *Ceratocystis cacaofunesta* (Engelbrecht & T.C. Harr.), and was associated to borers.

Our results allowed us to identify moniliasis as the main parasitological factor that has influenced the loss of cacao production and biodiversity in Chiapas, given that, when the disease destroys their production, farmers lose interest and leave their plantations or replace them with fruit crops. Also, cacao becomes an unprofitable crop because of the cost of spray program and control measures needed to curb the disease.

Overall, growers achieve agronomic activities and apply chemical fertilizers to control diseases in their plantations. 46.8 % farmers use chemicals to control diseases; this practice includes cutting infected fruit, pruning plants and shade regulation. For such control, farmers use copper, bicarbonate of soda, chlorine, lime, ashes or insecticides, which are incorporated into the same application. Growers also said that they apply a mix of sulphate and calcium, according to local agricultural technicians' recommendations. Those who apply these products said that they do not see a disease control but a decrease in production. Murillo and González (1984) said that an effective disease control largely depends on the selection of appropriate fungicides. Phillips (2004) suggested that the control of moniliasis is not effective, and that, if undertaken, it can be considered uneconomical. In Mexico, Torres *et al.* (2013) kept moniliasis under control using azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Suiza). However, the best and most economical option to control cacao diseases is genetic improvement (Avendaño *et al.*, 2013). Only one grower reported to use genetic control by empirically selecting plants resistant to *Phytophthora* sp., and using them for grafting. Currently, the same grower selects and tests materials resistant to *Moniliophthora roreri*, with support from the Mexican Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP).

Los productores, por lo general, realizan actividades culturales y aplicaciones de agroquímicos para el control de las enfermedades que observan en las plantas de cacao. El control cultural lo realiza el 46.8 % de productores y consiste en cortar los frutos enfermos, podas y regulación de la sombra. El control químico lo realizan con productos a base de cobre; el bicarbonato, cloro, cal, ceniza o insecticidas son incorporados en la misma aplicación. También mencionan aplicar caldo sulfocálcico elaborado a base de azufre y cal por recomendación de técnicos agrícolas locales para combatir la moniliasis; los productores que aplican esta mezcla mencionaron que no observan control de la enfermedad pero sí un decremento de la producción. Murillo y González (1984) mencionaron que el control eficiente de enfermedades en plantas depende mucho de la selección de los fungicidas adecuados. Phillips (2004), indicó que el control de la moniliasis en cacao no es eficaz y cuando se lleva a cabo se puede considerar como antieconómico. En México, Torres *et al.* (2013) controlaron la enfermedad con azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Suiza). Sin embargo, la opción más viable y económica de control de enfermedades en cacao es el mejoramiento genético (Avendaño *et al.*, 2013). Sólo un productor mencionó usar el control genético, al seleccionar de manera empírica materiales con resistencia a *Phytophthora* sp. y utilizar estos materiales para injertar. En la actualidad el mismo productor selecciona y evalúa materiales con tolerancia a *Moniliophthora roreri* con la asesoría del Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Los productores perciben que las plagas no constituyen una limitante para la producción de cacao. Los animales plaga identificados como problemas y su frecuencia en las parcelas productivas muestreadas fueron: ardillas (7.3 %), pájaros carpinteros (4.6 %) y tuzas (3.7 %). Estos provocaron daños en

Cocoa growers do not consider pests as a restriction to cacao production. Animal pests identified as a problem and their occurrence in the production plots sampled included squirrels (7.3 %), woodpeckers (4.6 %) and gophers (3.7 %). These pests damage fruit and reduce yields. Among insect pests, ants of the genus *Atta* (33.9 %) were the most commonly found; they are characterized by drilling galleries in the trunks and causing changes that affect the emergence of floral bearings, and also eating the skin of the fruit. In contrast, Goitia *et al.* (1992) mentioned that ants can contribute to cacao pollination and to the biological control of trips. Other insect pest detected during visits was aphids *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) with 11% of occurrence. Aphids feed on terminal portions of shoots and the youngest leaves, which results in deformities. Branch and stem borers (*Xyleborus ferrugineus* Fabricius, *Xylosandrus morigerus* Blandford, *Hypothenemus birmanus* Eichhoff, *Corthylus minutissimus* Schedl, *Taurodermus sharpi* Lenis, *Hypothenemus interstitialis* Hopkins) and budgerigar (*Vanduzeeia segmentata* Fowler) were found in 5.5 % of the sampled plots. These borers had been previously reported in cacao by Equihua (1992) and Pérez *et al.* (2009). Thrips (*Selenothrips rubrocinctus* Giard) were detected in only 3.7 % plots. Their damage was characterized by scratching and sap suction that cause leaves, flowers and small fruits to fall. When attacked by thrips plantlets often die. Thrips can also damage ripe fruit by developing dark spots on pods, thus making difficult to determine their maturity level and affecting fruit appearance. Spittlebug (*Clastoptera laenata* Fowler) was detected in 3.7 % plots. This hemipteran produces a foam layer that prevents the normal development of flowers, which, in turn, remain inactive and often die.

los frutos y merman el rendimiento de los cacaotales. Dentro de los insectos plaga, las hormigas del género *Atta* sp. (33.9 %) fueron los de mayor presencia y se caracterizaron por hacer galerías en el tronco y provocar alteraciones que afectan la emergencia de cojinetes florales, además de alimentarse de la corteza de los frutos. En contraste, Goitia *et al.* (1992) mencionaron que las hormigas pueden contribuir en la polinización del cacao y auxiliar en el control biológico de trips. Otros insectos plaga detectados durante las visitas fueron: el pulgón *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) con 11 % de frecuencia. Los pulgones se alimentan de las partes terminales de los retoños y de las hojas más jóvenes lo que ocasiona que se deformen. Los barrenadores de ramas y tallos (*Xyleborus ferrugineus* Fabricius, *Xylosandrus morigerus* Blandford, *Hypothenemus birmanus* Eichhoff, *Corthylus minutissimus* Schedl, *Taurodermus sharpi* Lenis, *Hypothenemus interstitialis* Hopkins) y el periquito *Vanduzeeia segmentata* Fowler) se presentaron en el 5.5 % de las parcelas muestreadas. Estos barrenadores han sido previamente reportados en cacao por Equihua (1992) y Pérez *et al.* (2009). Los trips (*Selenothrips rubrocintus* Giard) se detectaron en sólo el 3.7 % de las parcelas, su daño se caracterizó por raspar y succionan la savia y provocar la caída de hojas, flores y frutos pequeños; cuando ataca plántulas, éstas pueden llegar a morir. También pueden atacar frutos maduros donde provocan manchas oscuras en las mazorcas y así dificultar la determinación del grado de madurez y afectar la apariencia del fruto. El salivazo (*Clastoptera laenata* Fowler) se detectó en el 3.7 % de las parcelas. Este hemíptero, produce una espuma que impide el desarrollo normal de las flores que permanecen inactivas y llegan a morir.

Los productores no realizan ningún tipo manejo para controlar los animales e insectos plaga, con excepción de las hormigas, que son controladas

Farmers do not carry out any kind of management to control animal and insect pests, except for ants, that are controlled with Parathion-methyl®, a commercial product recommended by local agrochemical suppliers. According to this study, pests have not influenced a change in the use of varieties or adoption of other crops.

Morphological and molecular details for diagnosing diseases and identifying pests will be described in another document for reasons of space.

Cacao in the state of Chiapas can be considered a declining crop. The main cause of this is the phytosanitary, particularly a disease commonly known as moniliasis. This disease directly affects production and harvest, and increases production costs; for this reason farmers have lost interest in growing cocoa. In addition, there are other economic, social, cultural and agronomic aspects, including increased production costs, lower yields, poor economic return, low educational level, growers with little education and training, little participation by women, limited membership in farmer association, little access to improved varieties and small production units. It is a shame that a crop such as cacao, which is part of our history, our culture and plays an important role within the ecosystem is now declining. For this reason, it is crucial to implement strategies for alleviating the problems that limit its production and make it once again a viable financial source that is sustainable and attractive to farmers.

#### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the following for their support to this research: Chiapas Cacao Growers, Cacao Production Associations, the Mexican Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP), the National Council for Science and Technology-Chiapas (COCYTECH), and the National System for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (SINAREFI).

con paratión metílico®, producto recomendado por los negocios locales de agroquímicos. De acuerdo a este estudio, las plagas no han influido en el cambio de uso de variedades, ni la conversión a otros cultivos.

Los detalles morfológicos y moleculares para el diagnóstico de las enfermedades y e identificación de las plagas será presentada en otro documento por cuestiones de espacio.

El cultivo de cacao en el estado de Chiapas se puede clasificar como un cultivo en decadencia. El principal factor que ha contribuido al estado actual del cacao en Chiapas es el fitosanitario y en particular la enfermedad conocida comúnmente como moniliasis. La enfermedad afecta directamente la producción, cosecha, costos de producción e interés de los productores en el cultivo, a lo anterior se adicionan aspectos económicos, socio culturales y agronómicos como: mayores costos de producción, disminución en el rendimiento, escaso retorno económico, escasa preparación académica y capacitación de los productores, poca participación femenina, poca aglutinación de productores en asociaciones, difícil acceso a variedades y cultivares con características de excelencia y unidades de producción pequeñas. Es una pena que un cultivo como el cacao que es parte de nuestra historia, forma parte de nuestra cultura y tiene un papel importante dentro del ecosistema, se encuentre en el estado de decadencia actual. Es urgente implementar estrategias para mitigar los problemas que limitan su producción y convertirlo nuevamente en una fuente económica viable, sostenible y atractiva para los agricultores.

#### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a los Productores de Cacao de Chiapas, a las Asociaciones Cacaoteras del Estado, al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), al Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología (CONACYT), al Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Chiapas (COCYTECH), al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI), por el apoyo asignado a esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- Agarwal B. 1992. The Gender and Environment Debate: Lessons From India. *Feminist Studies* 18(4): 119-158.
- Aguirre MJF. 2009. Historia y situación actual del cacao. En: Moisés Alonso y Aguirre Juan Francisco. Manual de producción de cacao. p.109. INIFAP, México.
- Avendaño ACH, Mendoza LA, Hernández GE, López GG, Martínez BM, Caballero PJF, Guillen DS. y Espinosa ZS. 2013. Mejoramiento genético participativo en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agroproductividad* 6(5): 71-80.
- Avendaño ACH, Villareal-FJM, Campos RE, Gallardo MRA, Mendoza LA, Aguirre MJF, Sandoval EA, Espinosa ZS. 2011. Diagnóstico de cacao en México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 80p.
- Beer JW. 1988. Litter production and nutrient cycling in coffee (*Coffea arabica*) or cacao. (*Theobroma cacao*) plantations with shade trees. *Agroforestry Systems* 7(2):103-114
- Córdova AV. 2005. Organización campesina en la reconversión del cacao tradicional a orgánico en Tabasco, México. En: Aragón A, López JF, Tapia AM. Manejo Agroecológico de Sistemas. Dirección de fomento editorial. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Primera Edición. 180.
- Córdova AV, Sánchez HM, Estrella CNG, Sandoval CE, Ortiz GCF. 2001. Factores que afectan la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el ejido Francisco I. Madero del Plan Chontalpa, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 17(34): 93-100.
- Cortez R, y Pizarro A. 2001. Construyendo el desarrollo sostenible con equidad de género. En La ineludible corriente. Políticas de equidad de género en el sector ambiental mesoamericano. Comp. y ed. Lorena Aguilar. UICN, 1a. Ed. San José, Costa Rica. 25 -33.
- Díaz JO, Aguilar AJ, Rendón MR. y Santoyo CVH. 2013. Situación actual y perspectivas de la producción de cacao en México. *Ciencia e Investigación Agraria* 40(2): 279-289.
- Engler, A., and Toledo, R. 2010. An analysis of factors affecting the adoption of economic and productive data recording methods of Chilean farmers. *Ciencia e Investigación Agraria* 37(2):101-109.
- Equihua MA. 1992. Coleópteros Scolytidae atraídos a trampas NTP-80 en el Soconusco, Chiapas, México. *Folia Entomológica Mexicana* 84: 55-66. [http://www.barkbeetles.info/pdf\\_assets/Equihua\\_1992\\_FEM\\_84.pdf](http://www.barkbeetles.info/pdf_assets/Equihua_1992_FEM_84.pdf)
- Ghiglione R, Matalón B. 1989. Las encuestas sociológicas. Teoría y práctica. Editorial Trillas, México. 318 p.
- Goitia W, Bosque C. and Jaffe K. 1992. Interacción hormiga-polinizador en cacao. *Turrialba* 42(2): 178-186.
- González VW. 2005. Cacao en México: competitividad y medio ambiente con alianzas (Diagnóstico rápido de producción y mercadeo). United States Agency International Development. Chemonics International Inc. 93 p.

- Legislación Agraria. 2004. Legislación Agraria. DOF 09-04-2012. [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/13.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/13.pdf)
- León J. 1987. Botánica de los cultivos Tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 337 p.
- Maier HE. 2003. Construyendo la relación entre la mujer y el medio ambiente: Una exploración conceptual, en: Esperanza, Tuñón (coord.). Género y medio ambiente. El Colegio de la Frontera Sur. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Plaza y Valdés, México: 27-44.
- Motamayor JC, Risterucci AM, López PA, Ortiz CF, Moreno A. and Lanaud C. 2002. Cacao domestication I. the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380-386.
- Moore-Landecker E. 1996. *Fundamental of fungi*. Prentice Hall. Nueva Jersey, EUA. pp. 238- 367.
- Murillo D, González LC. 1984. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la moniliasis del cacao. *Agronomía Costarricense* 8: 83-89.
- Nájera CMI. 2012. El mono y el cacao: la búsqueda de un mito a través de los relieves del Grupo Serial Inicial Chichen Itza. *Estudios de cultura Maya* 39: 133-172.
- Parrish J, Reitsma R, Greenberg R, MacLarney MR, and Lynch J. 1999. Los cacaotales como herramienta para la conservación de la biodiversidad en corredores biológicos y zonas de amortiguamiento. *Agroforestería en las Américas* 6(22): 35.
- Pérez CM, Equihua MA, Romero NJ, Sánchez SS, García LE, Bravo MH. 2009. Escolítidos (Coleoptera: Scolytidae) Asociados al Agroecosistema Cacao en Tabasco, México. *Neotropical Entomology* 38 (5): 602-609. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2009000500007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2009000500007)
- Phillips MW. 2004. La moniliasis del cacao: una seria amenaza para el cacao en México. In: Simposio Nacional sobre enfermedades tropicales. Resúmenes de ponencias. Tabasco, México: 91-99.
- Phillips MW, Coutiño A, Ortiz CF, López AP, Hernández J, and Aime MC. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55 (4): 584
- Ploetz RC. 2007. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology* 97 (12): 1634-1639. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-97-12-1634>
- Quispe A. 2013. El uso de la encuesta en las ciencias sociales. Ediciones D.D.S. México D.F. 105 p.
- Ramírez DFJ. 1997. Sistema agroindustrial del cacao en México y su comportamiento en el mercado. Universidad Autónoma Chapingo. México. 161.
- Ramírez GSI. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en Marcha* 21(1): 97-110. [http://tecdigital.tec.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec\\_marcha/article/view/1343](http://tecdigital.tec.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec_marcha/article/view/1343)
- Roa RHA, Salgado MM y Álvarez HJ. 2009. Análisis de la estructura arbórea del sistema agroforestal de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Soconusco, Chiapas, México. *Acta biológica Colombiana* 14(3): 97-110.
- Sagarpa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, julio 2013).
- Salgado MM, Ibarra NG, Macías SJE, López BO. 2007. Diversidad arbórea en cacaotales del Soconusco, Chiapas, México. *Interciencia* 11(32): 763-768. <http://www.scielo.org.ve/pdf/inci/v32n11/art09.pdf>
- SIAP. 2014. Cierre de la producción agrícola por cultivo SAGARPA. México. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Consultado en línea en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Suárez SRB, Zapata ME, Ayala CR, Cárcamo TN, y Manjarrez RJ. 2011. ¿...y las mujeres rurales?. Indesol. GRMTRAP A.C., México: 251 p.
- Torres CM, Ortiz GCF, Téliz OD, Mora AA y Nava DC. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 65-69.
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y: Academic Press, Inc.: 315-322pp.

# Comportamiento espacial de la roya transversal del gladiolo en Jiquipilco, Estado de México, México

## Spatial behavior of gladiolus rust in Jiquipilco, State of Mexico, Mexico

**Rosalba Quiñones-Valdez**, Alumna del Programa de Postgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo Toluca 50200, Estado de México, México; **Jesús Ricardo Sánchez-Pale\***, Álvaro **Castañeda-Vildozola**, CIEAF, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Toluca 50200, Estado de México, México; **Magaly Cristóbal de la Cruz**, Alumna de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Toluca 50200, Estado de México, México. \*Correspondencia: jrsanchezp@uaemex.mx.

**Recibido:** Junio 11, 2015.

**Aceptado:** Julio 06, 2015.

Quiñones-Valdez R, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildozola A y Cristóbal de la Cruz M. 2015. Comportamiento Espacial de la Roya Transversal del Gladiolo en Jiquipilco, Estado de México, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 247-255.

**Resumen.** En la región norte del Estado de México el cultivo de gladiolo (*Gladiolus communis* L.) se ha considerado como una zona con ausencia de roya, sin embargo en los últimos ciclos se han tenido reportes no oficiales de su presencia, pero se desconocen sus daños y los patrones de distribución espacial que presenta en esta nueva área. El objetivo del presente estudio fue determinar el comportamiento espacial de la roya transversal del gladiolo en el municipio de Jiquipilco, y visualizarlo a través de mapas. Se evaluó la incidencia y severidad que presentaron las plantas durante tres etapas fenológicas, en 121 puntos de muestreo georeferenciados en cada una de las dos parcelas evaluadas durante los ciclos invierno-primavera y verano-otoño de 2013 y 2014. La enfermedad no se presentó en 2013 ni en invierno-verano 2014; sin

**Abstract.** The northern region of the State of Mexico had been considered a gladiolus rust-free zone. However, in the last cycles, unofficial reports have mentioned the presence of the fungus in this area. Damages that it could cause and its spatial distribution in this zone are unknown. The purpose of this study was to estimate the spatial behavior of gladiolus rust in the municipality of Jiquipilco to elaborate distribution maps. Disease incidence and severity were evaluated during three phenological stages in 121 georeferenced sampling points. Two plots per cycle were evaluated during winter-spring and summer-autumn cycles during the years of 2013 and 2014. Gladiolus rust did not occur during 2013 and the summer-autumn period in 2014. It was detected during the summer-fall cycle of 2014, at spathe stage, with medium severity values ranging 1.4 to 2.5, and percentages of incidences of 30.5 to 69.4 %. Spatial behavior of disease severity fitted at spherical model. Results of disease interpolations are presents as maps.

**Key words:** gladiolus, spatial model, kriging, severity maps



embargo se detectó durante el verano-otoño 2014, con una severidad media de 1.4 a 2.5, e incidencias de 30.5 a 69.4 %, presentándose a partir de la etapa fenológica de espata. El comportamiento espacial fue de tipo agregado, ajustándose al modelo esférico y se logró su visualización con los mapas generados.

**Palabras clave adicionales:** gladiola, modelo espacial, krigeado, mapas de severidad

El cultivo de gladiolo (*Gladiolus communis* L.) en la región norte del Estado de México se ha considerado como una zona con ausencia de roya (CESAVEM, 2013), sin embargo en los últimos ciclos se han tenido reportes no oficiales de sus presencia, pero se desconocen sus daños y distribución espacial.

En recorridos realizados se ha confirmado la ocurrencia de pústulas de color amarillo-anaranjadas en el follaje, que se ubican transversalmente a las nervaduras de la hoja, los cuales son síntomas típicos de la roya transversal ocasionada por el hongo *Uromyces transversalis* (Thumen) G. Winter. Esta especie afecta principalmente al cultivo del gladiolo, aunque se ha reportado en otros miembros de la familia Iridiaceae como *Crocasmia*, *Freesia*, *Melasphaerula*, *Tritonia* y *Watsonia* (Schubert *et al.*, 2006). El hongo ocasiona daños al follaje y demerita la calidad de la flor para su comercialización, provoca fuertes daños económicos en la producción, así como un decremento en las exportaciones (Valencia-Botin *et al.*, 2013). Daños mayores a 60 %, causan una pérdida total en el valor comercial de la flor, y cuando la infección ocurre en etapas tempranas hay una reducción en la calidad así como en el calibre del cormo. Su presencia en etapas tardías favorece la diseminación del inóculo a través del cormo infestado, a otras parcelas o regiones (SENASICA, 2008). Su diseminación se da

*Gladiolus* (*Gladiolus communis* L.) is considered a rust-free crop in the northern part of the State of Mexico (CESAVEM, 2013). However, rust has been unofficially reported in the last crop cycles, but there is no information available on damages or about its spatial distribution.

Field tours have confirmed the presence of yellowish-orange pustules which develop across leaf veins. These are symptoms typically caused by the fungus *Uromyces transversalis* (Thumen) G. Winter. Though this pathogen mainly attacks gladiolus crops, it has also been detected in other members of the Iridiaceae family, including *Crocasmia*, *Freesia*, *Melasphaerula*, *Tritonia* and *Watsonia* (Schubert *et al.*, 2006). The fungus mainly attacks the leaves and lowers quality of flowers for marketing, causing strong economic damages to production and reducing exports (Valencia-Botin *et al.*, 2013). When damages exceed 60%, the flowers commercial value is totally lost; if the infection occurs at early stages, the quality of flowers and their corm thickness may be diminished. When the disease emerges at late stages it favors inoculum spreading through infested corms to other plots or regions (SENASICA, 2008). The fungus can be disseminated by the wind, infected leaves and stalks, and by corms, rhizomes and flowers infected with rust spores (SENASICA, 2008).

To develop strategies for managing this emerging disease, it is necessary to carry out research on its time-space dynamics. Through this research the spatial behavior of gladiolus rust in the municipality of Jiquipilco, State of Mexico, was determined, and maps of its spatial distribution by plot were developed.

**Sampling.** In the 2013 and 2014 winter-summer and summer-fall cycles, two 1-hectare commercial plots were evaluated in the municipality of Jiquipilco, State of Mexico. Plots were sown with

por el viento, por hojas y tallos infectados así como por cormos, rizomas y flores contaminados con esporas de la roya (SENASICA, 2008).

Para generar estrategias de manejo de esta enfermedad emergente, es necesario contar con estudios de su dinámica en tiempo y espacio. En el presente trabajo se determinó el comportamiento espacial de la roya transversal del cultivo de gladiolo en el municipio de Jiquipilco, Estado de México, y se generaron mapas de su distribución espacial a nivel parcelario.

**Muestreos.** Durante los ciclos agrícolas invierno-verano y verano-otoño de los años 2013 y 2014 se evaluaron dos parcelas comerciales de una ha/ciclo en el Municipio de Jiquipilco, Estado de México. Las parcelas fueron sembradas con la variedad roja borrega, a una distancia entre surcos de 0.80 m y una densidad de 250,000 plantas/ha. En el ciclo invierno-verano los muestreos se realizaron a los 60 días después de la siembra (dds, etapa vegetativa), a los 80 dds (etapa de espata) y a los 113 dds (etapa de floración). En verano-otoño, los muestreos se realizaron a los 78, 103 y 120 dds. En cada parcela se estableció una malla de 100 m por cada lado, donde se marcaron puntos de muestreo a cada 10 m, para un total de 121/parcela. En cada punto se determinó la severidad e incidencia de la enfermedad de una planta. Se identificaron las pústulas del hongo ubicadas en forma horizontal (perpendicular) con respecto a las nervaduras de la hoja. Se tomaron muestras de tejido afectado para el reconocimiento morfológico de las estructuras en laboratorio. La severidad de la roya se estimó mediante una escala compuesta por seis clases: 1 (sano, sin síntomas visibles), 2 (<15 % área foliar dañada), 3 (16 a 30 %), 4 (31 a 45 %), 5 (46 a 60 %) y 6 (>60 %).

**Análisis geoestadístico.** Las plantas de cada punto de muestreo fueron ubicadas geográficamente

the Roja Borrega variety using 0.80 m row spacing and a density of 250,000 plants/ha. In the winter-summer cycle sampling was performed 60 days after sowing (DAS, growth stage) 80 DAS (bract stage) and 113 DAS (flowering stage). In the summer-fall cycle, sampling was performed at 78, 103 y 120 DAS. For this, a 100-m wire mesh was placed on each side of the plots; then, sampling points at 10-m intervals were established for a total of 121 per plot. The severity and recurrence of the disease in a plant was determined at each point. The Pustules of the fungus were identifiable for the development horizontally across the veins, perpendicular of infected leaf. Samples of the infected tissue were taken for morphological recognition of the structures in the lab. Rust severity was estimated using a 1-6 scale: 1 (healthy with no visible symptoms), 2 (<15 % leaf area damaged), 3 (16 a 30 %), 4 (31 to 45 %), 5 (46 to 60 %) and 6 (>60 %).

**Geostatistical analysis.** Plants at each sampling point were geographically located using a Differential Global Positioning System (dGPS) (Model SPS351, Trimble). The experimental semivariogram was calculated according to the model of Isaaks and Srivastava (1989); the best model with the best fit was selected and the spatial interpolation was performed using the kriging method. The experimental semivariogram was developed using VarioWin 2.2 (Software for Spatial Data Analysis in 2D).

The spatial dependency level was calculated by dividing the nugget effect by the sill value (López-Granados *et al.*, 2002). Estimates of the spatial distribution of the disease at different phenological stages were mapped using Surfer 9.0 (Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14<sup>th</sup> Street Golden, CO).

mediante un sistema de posicionamiento global diferencial (dGPS) (Modelo SPS351, Trimble). Se calculó el semivariograma experimental de acuerdo a lo establecido por Isaaks y Srivastava (1989), se determinó el modelo con mejor ajuste y se realizó una interpolación espacial mediante el método de kriging. El semivariograma experimental fue obtenido a través del programa VarioWin 2.2 (Software for Spatial Data Analysis in 2D).

Se calculó el nivel de dependencia espacial dividiendo el efecto pepita (nugget) entre el valor de la meseta (sill) (López-Granados *et al.*, 2002). Las estimaciones de la distribución espacial de la enfermedad en las diferentes atapas fenológicas fueron representadas en un mapa a través del programa Surfer 9.0. (Surface Mapping System, Golden Software Inc. 809, 14<sup>th</sup> Street Golden, CO).

**Detección.** No se detectó roya en los dos ciclos de producción de gladiola del año 2013 ni en el ciclo invierno-verano 2014. En verano-otoño 2014, se detectó la enfermedad en las dos parcelas evaluadas. En la parcela dos, la roya transversal se presentó a partir de la etapa de espata mientras que en la parcela uno se presentó hasta la etapa de floración. La ocurrencia de la enfermedad estuvo asociada a la presencia de humedad en las hojas y temperaturas promedio de 14.6 °C (INIFAP, 2015), las cuales son consideradas favorables para la germinación y sobrevivencia de las uredosporas (Aloj *et al.*, 1981; Peterson y Berner, 2009) así como una reducción en la frecuencia de aplicación de fungicidas por parte del productor.

Los síntomas observados fueron pústulas de color amarillo-anaranjadas en el follaje, ubicadas transversalmente con relación a las nervaduras de la hoja. El incremento en el nivel de incidencia de la enfermedad de la etapa de espata a floración en la parcela uno (Cuadro 1) es indicativo de que la

**Detection.** No rust was detected in the 2013 gladiolus production cycles or the 2014 winter-summer cycle. In the 2014 summer-fall cycle the disease was detected in the two evaluated plots. In plot 2, gladiolus rust was detected starting at the bract stage, while in plot 1 it was observed at flowering. Rust occurrence was associated to leaf wetness and an average temperature of 14.6 °C (INIFAP, 2015, which favor uredospores germination and survival (Aloj *et al.*, 1981; Peterson and Berner, 2009), as well as a reduction in the frequency with which farmers apply fungicides.

Symptoms observed included yellowish-orange pustules on leaves, located horizontally across leaf veins. The increased level of incidence from the sphate stage to the flowering stage in plot 1 (Table 1) suggests that the disease was able to spread from plant to plant within the same plot due to production of new inoculum. Microscopic examinations showed ovoid, ellipsoidal or oblong uredospores with a hyaline cell wall and isolated dark germinal pores, which are similar to those reported by Rodríguez-Alvarado *et al.* (2006), Blomquist and Thomas (2007). This is the first time the presence of gladiolus rust is reported in the northern region of the State of Mexico.

Final disease incidence was 30.6 % for plot 1 and 69.4 % for plot 2 at 120 DAS (Table 1); this was lower than those reported by Blomquist and Thomas (2007) in California, and by Rodríguez-Alvarado *et al.* (2006) in Michoacán. Intermediate severity in plot 1 was 1.4 and 2.5 in plot 2.5 (Table 1).

Rust emergence in the studied region may have been caused by spores disseminated in corms carried by farmers to sow new fields, yet spores can also be carried long distances by the wind (Agrios, 2004; SENASICA, 2008). Rust is being detected at the same time that *Hemileia vastatrix* is being reported in coffee crops in Mexico (Mora-Aguilera

**Cuadro 1.** Incidencia, severidad, valores estadísticos y parámetros de los modelos ajustados a los semivariogramas obtenidos en el muestreo de roya del gladiolo, en Jiquipilco, México, durante el ciclo verano-otoño en 2014.

**Table 1.** Incidence, severity and statistical values and parameters of the models adjusted to semivariograms of gladiolus rust sampling in Jiquipilco, Mexico, in the 2014 summer-fall cycle.

| Parcela | dds <sup>a</sup> | Incidencia (%) | Severidad (media) | Desviación estándar | Normalidad | Modelo   | Pepita | Meseta | Rango | Pepita/Meseta % | Nivel de Dependencia |
|---------|------------------|----------------|-------------------|---------------------|------------|----------|--------|--------|-------|-----------------|----------------------|
| 1       | 78               | -              | -                 | -                   | -          | -        | -      | -      | -     | -               | -                    |
|         | 103              | -              | -                 | -                   | -          | -        | -      | -      | -     | -               | -                    |
|         | 120              | 30.57          | 1.40              | 0.70                | 1.89       | Esférico | 0      | 0.02   | 1.15  | 0               | Alto                 |
| 2       | 78               | -              | -                 | -                   | -          | -        | -      | -      | -     | -               | -                    |
|         | 103              | 23.56          | 1.40              | 0.93                | 2.88       | Esférico | 0      | 0.03   | 1.70  | 0               | Alto                 |
|         | 120              | 69.42          | 2.45              | 1.44                | 0.25       | Esférico | 0      | 0.05   | 1.00  | 0               | Alto                 |

<sup>a</sup>dds: Días después de la siembra / <sup>a</sup>DAS: Days after sowing.

enfermedad fue capaz de propagarse de planta a planta dentro de la misma parcela, por la producción de nuevo inóculo. La observación en el microscopio indicó la presencia de uredosporas de forma ovoide, elipsoidales u oblongas, con pared celular hialina y poros germinales oscuros aislados, tales características concuerdan con lo reportado por Rodríguez-Alvarado *et al.* (2006), Blomquist y Thomas (2007). Este resultado significa el primer reporte de la presencia de roya transversal en el cultivo del gladiolo para la región norte del Estado de México.

Las incidencias finales de la enfermedad fueron de 30.6 % para la parcela uno y de 69.4 % para la parcela dos a los 120 dds (Cuadro 1), las cuales fueron menores a lo reportado por Blomquist y Thomas (2007) para California y por Rodríguez-Alvarado *et al.* (2006) para Michoacan. La severidad media para la parcela uno fue de 1.4 mientras que en la parcela dos fue de 2.5 (Cuadro 1).

La aparición de la enfermedad en esta región, pudo deberse a la diseminación de esporas portadas en los cormos movilizados por los productores para utilizarlos en el establecimiento de las nuevas plantaciones, pero también es posible el transporte de esporas a grandes distancias por el viento (Agrios,

*et al.*, 2014) and Central America. It might be that changes in weather patterns contribute to quick germination of uredospores and therefore a greater production of gladiolus rust inoculum (Peterson and Berner, 2009).

Semivariograms resulting from samplings were adjusted to the spherical theoretical model (Cuadro 1), which shows the level of rust severity, and were expressed as specific points within the plot compared to the rest of the sampled points. Results suggest that the disease could have developed from contaminated materials (Roberto *et al.*, 2002) such as corms (SENASICA, 2008), that are the primary source of inoculum. The high spatial dependence (Table 1) observed suggests that the severity of the disease shows an aggregated distribution among the different sampling points in the plot, which is explained by the estimated semivariograms.

The maps we developed allowed us to visualize the spatial behavior of gladiolus rust severity in aggregation points and disease gradients in the two plots in 2014 (Figure 1). The map of plot 1 at 120 DAS showed the presence of aggregation points distributed across the eastern part of the plot, from the northern part to the southern part; there was a slight slope in that part. On the other hand, maps

2004; SENASICA, 2008). La detección de este patógeno está ocurriendo a la par de reportes de ocurrencia de *Hemileia vastatrix* en cultivos de café de México (Mora-Aguilera *et al.*, 2014) y Centro América. Es posible que cambios en los patrones de temperaturas propicien una rápida germinación de uredosporas que facilite una mayor producción de inóculo de la roya transversal del gladiolo (Peterson y Berner, 2009).

Los semivariogramas obtenidos a partir de los muestreos tuvieron un ajuste al modelo teórico esférico (Cuadro 1), lo cual es indicativo de la severidad de la roya al expresarse en puntos específicos dentro de la parcela respecto al resto de los puntos muestreados lo que soporta la probabilidad que la enfermedad se originó a partir de material contaminado (Roberto *et al.*, 2002) como son los cormos (SENASICA, 2008) que representan la fuente primaria de inóculo. La alta dependencia espacial (Cuadro 1) observada indica que la severidad de la enfermedad presenta una distribución de tipo agregada entre los diferentes puntos de muestreo de la parcela, la cual es explicada con los semivariogramas calculados.

Los mapas generados permitieron visualizar el comportamiento espacial de la severidad de la roya transversal del gladiolo en focos de agregación, en las dos parcelas del año 2014 (Figura 1), así como los gradientes de la enfermedad que presentó. En el mapa obtenido en la parcela 1 a los 120 dds, se observó la presencia de centros de agregación distribuidos por toda la región este de la parcela, desde la zona norte hasta la sur, dicha zona coincidió con una ligera pendiente. Por otro lado, en los mapas de la parcela dos, se observó una mayor cantidad de centros de agregación con respecto al mapa de la etapa previa de espata (Figura 1). Los centros de agregación se ubicaron en la región norte del mapa, desde la zona este a oeste, visualizando con mayor intensidad los centros de agregación en la zona este del mapa.

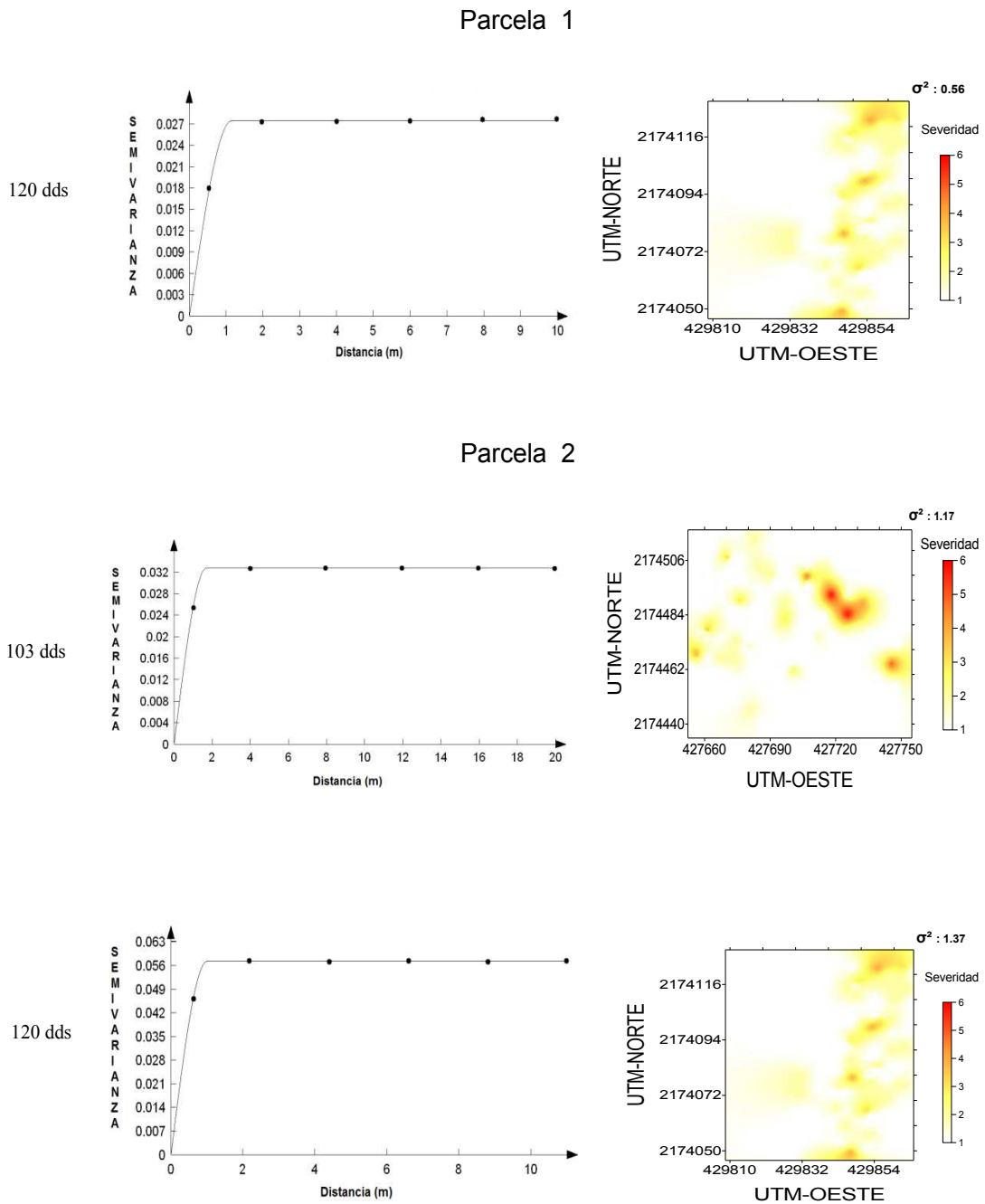
of plot 2 showed a greater number of aggregation points compared to map developed during the previous bract stage (Figure 1). Aggregation points were located in the northern part of the map, from the eastern to the western area. The aggregation points in this area of the map were observed to have greater intensity.

The aggregation observed suggests that the management strategy used by farmers in the northern region of the State of Mexico, which includes spraying the entire gladiolus plot, can be replaced by a specific site or point disease management (Carvalho *et al.*, 2009). This means carrying out an analysis of the spatial patterns of the disease. Also, spatial aggregation suggests that different control measures should be taken and sampling activities should be conducted in specific areas or sites (Navas-Cortés *et al.*, 2008) where the disease is present.

The use of aggregation maps, such as those developed for gladiolus rust, allows targeting control strategies precisely to specific areas of infestation, as well as sources of inoculum (infected corm, among others) which cause the disease to spread. This represents the basis of site specific management, which would result in cost savings and less environmental impact before the disease spreads. The application of contact fungicides up to the bract stage, removal of damaged plants or leaves in the specific infestation points, especially in the early stages of the disease and targeting the sampling activities justify the use of precision agriculture techniques to control damages caused by gladiolus rust in the northern region of the State of Mexico.

#### Acknowledgements

The authors thank the PROMEP UAEM-PTC-356 (FE38/2013) project for funding this research.



**Figura 1.** Mapas y semivariogramas del comportamiento espacial de la roya transversal del gladiolo en diferentes fechas de muestreo en Jiquipilco, Estado de México.

dds: días después de la siembra; S2: varianza de los valores estimados.

**Figure 1.** Semivariograms and maps the spatial behavior of gladiolus rust in different sampling dates in Jiquipilco, State of Mexico.

DAS: days after sowing; S2: variance of estimated values

La agregación visualizada indica que la estrategia de manejo, que realizan los productores del norte del estado, de realizar aspersiones totales sobre toda la parcela de gladiolo puede ser reemplazada por el manejo de la enfermedad desde la perspectiva de sitio o punto específico (Carvalho *et al.*, 2009) que implica realizar un análisis de los patrones espaciales de la enfermedad, además la agregación espacial sugiere aplicar diversas acciones de control y dirigir las actividades de muestreo sobre las áreas o sitios específicos (Navas-Cortés *et al.*, 2008) donde está presente la enfermedad.

Con mapas de agregación, como los obtenidos para la roya transversal del gladiolo, es posible dirigir las estrategias de control de forma precisa a áreas específicas de infestación así como a fuentes de inóculo (corno infestado, etc.) que originan la posterior propagación de la enfermedad, que representa las bases iniciales de manejo en “sitios específicos”, que permitiría lograr ahorros económicos y un menor impacto al medio ambiente al reducir el uso de fungicidas en su manejo, en etapas previas a que se generalice la enfermedad. El empleo de fungicidas de contacto hasta la etapa de espata, la eliminación de plantas u hojas con daños de la roya en los puntos específicos de infestación, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad y el direccionamiento de las actividades de muestreo, permiten justificar el uso de las técnicas de la agricultura de precisión para mantener bajo control los daños causados por la roya en la región norte del Estado de México.

#### Agradecimientos

Al proyecto PROMEP UAEM-PTC-356 (FE38/2013) por los recursos otorgados para la realización de la presente investigación.

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2004. Fitopatología. 2da Edición. Limusa. México, D.F. 635p.
- Aloj B, Albano V, and Garibaldi A. 1981. Ricerche su alcuni aspetti epidemiologici della ruggine *Uromyces transversalis* (Thüm.) Winter del gladiolo. Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università degli Studi di Napoli Portici IV 15:81–85.
- Blomquist CL and Thomas S.IL. 2007. First report of *Uromyces transversalis*, causal agent of gladiolus rust, in San Diego County, California. Plant Disease 91:1202
- Carvalho AM, Moreira SF, Ampelio PE, Silva OM. 2009. Modeling spatial variability and pattern of rust and brown eye spot in coffee agroecosystem. Journal Pest Science 82: 137–148
- CESAVEM, Comité de Sanidad Vegetal del Estado de México. 2013. Manejo Fitosanitario de Ornamentales. <http://www.cesavem.org/?accion=ornamentales>. (consulta, Noviembre de 2013).
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4a ed. UNAM. México, D. F. 220 p.
- INIFAP, Instituto de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. 2015. Red de estaciones. <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/historicos.aspx?est=36756&edo=10&d=21&m=10&an=2014> (consulta, Julio 2015).
- Isaaks EH and Srivastava RM. 1989. An introduction to applied geostatistics. Oxford University Press. New York. 561p.
- López-Granados F, Jurado-Expósito M, Atenciano S, García-Ferrer A, Sánchez M and García-Torres L. 2002. Spatial variability of agricultural soil parameters in southern Spain. Plant Soil 246: 97-105
- Mora-Aguilera G, González-Gómez R, González-Ochoa M, Ramírez-Mendoza C, López-Guzmán I, López-Buenfil A, Flores-Sánchez J, López-Pérez E, Méndez-Ramos A y Méndez-Gómez L. 2014. Análisis espacio-temporal de la roya del café en Chiapas, Veracruz y Puebla. Revista Mexicana de Fitopatología 32(suplemento):S42
- Navas-Cortés JA, Landa BB, Mercado-Blanco J, Trapero-Casas JL, Rodríguez-Jurado D and Jiménez-Díaz RM. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree density olive orchard in southern Spain. Phytopathology 98: 167-180
- Peterson GL and Berner DK. 2009. Effects of temperature and humidity on the survival of urediniospores of gladiolus rust (*Uromyces transversalis*). European Journal of Plant Pathology 125: 509–513
- Roberto SR, Farias PRS and Bengamin, FA. 2002. Geostatistical analysis of spatial dynamics of citrus variegated chlorosis. Fitopatologia Brasileira 27:599-604.
- Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP, Valenzuela-Vázquez M and Loya-Ramírez JG. 2006. First report of gladiolus rust caused by *Uromyces transversalis* in Michoacán, México. Plant Disease 90:605
- Schubert T, Leahy R. and Silagy A. 2006. Pest alert. gladiolus rust (*Uromyces transversalis*) arrives in the U.S.: Florida and California. Florida dept of agric. and

consumer services, <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology%5Cgladiolus-rust.html> (consulta, Junio 2015).  
SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2008. Cartilla de Campo Roya del gladiolo. [www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?iddocumento=1242](http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?iddocumento=1242) (consulta, Enero 2015).

Valencia-Botin AJ, Jeffers SN, Palmer CL and Buck JW. 2013. Fungicides used alone, in combinations, and in rotations for managing gladiolus rust in Mexico. *Plant Disease* 97:1491-1496.



# Sensibilidad *in vitro* de dos especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas

## *In vitro* sensitivity of two species of *Sclerotinia* spp. and *Sclerotium cepivorum* to agents of biological control and fungicides

Luis Pérez Moreno\*, José Roberto Belmonte Vargas, Héctor Gordon Núñez Palenius, Rafael Guzmán Mendoza, Briseida Mendoza Celedón. Cuerpo Académico de Protección Vegetal (UGTO-CA-81), Departamento de Agronomía, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, km 9 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Gto., C. P. 36821. México. \*Correspondencia: luispm@ugto.mx.

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Julio 09, 2015.

Pérez-Moreno L, Belmonte-Vargas JR, Núñez-Palenius HG, Guzmán-Mendoza R y Mendoza-Celedón B. 2015. Sensibilidad de especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 256-267.

**Resumen.** Se evaluó la respuesta *in vitro* de dos aislados de *Sclerotinia minor*, cinco de *S. sclerotiorum*, y dos de *Sclerotium cepivorum* a 16 agentes biológicos y ocho fungicidas en un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo factorial por cada patógeno. El factor A correspondió a los aislados del hongo y el factor B a los productos de control. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Se hicieron 11 evaluaciones cada 24 horas del crecimiento promedio radial micelial (Cprm). En ningún caso se encontró efecto de aislado, solo o en interacción con los productos de control. Dicloran, Benomilo, Ciprodinilo-Fludioxonilo y Tebuconazole inhibieron el desarrollo micelial de todos los hongos en mayor proporción que los agentes biológicos (AB) con un

**Abstract.** The *in vitro* response of two *Sclerotinia minor*-, five *S. sclerotiorum*- and two *Sclerotium cepivorum*-isolates to 16 biological control agents and eight fungicides was evaluated. A split plot experimental design was used, with a factorial arrangement correction for each pathogen. Factor A corresponded to fungi isolates and Factor B to control agents. The comparison of means was carried out using a Tukey test ( $P < 0.05$ ), having 11 evaluations every 24 h of the Mycelial radial growth rates (Mrgr). In any case no effect was found, alone or in interactions with control agents. Dicloran, Benomyl, Tebuconazole and Cyprodinil-Fludioxonil inhibited the mycelial growth of all fungi with a final average of 1.0 Mrgr, and in greater proportion than biological agents (BA). The BA that propitiated the lesser mycelial growth towards *S. minor* were: Microorganisms (BPG-Plus), *Trichoderma* sp. (*Trichoderma*), *T. viride* (*Esporalis*) and *Bacillus subtilis* (*Serenade max*); with isolates of *S. sclerotiorum*, *Trichoderma* sp. (*Trichoderma*), *Trichoderma harzianum* (*Natucontrol*), Microorganisms (BPG-Plus) and *T.*

promedio final de 1.0 Cprm. Los AB que propiciaron el menor crecimiento promedio radial micelial (Cprm, cm), en *S. minor* fueron Microorganismos (BPG-Plus), *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis) y *Bacillus subtilis* (Serenade max) con 1.2, 1.3, 1.5 y 1.9 Cprm, respectivamente. En *S. sclerotiorum*, *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *Trichoderma harzianum* (Natucontrol), Microorganismos (BPG-Plus) y *T. harzianum* (Biotricho-H) fueron los más inhibidores con 1.5, 1.6, 2.4 y 2.5 Cprm, respectivamente. *S. cepivorum*, *Trichoderma* sp., (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis), *T. harzianum* (Natucontrol) y Microorganismos (BPG-plus) fueron las más sobresalientes con 1.0, 1.7, 2.6, y 2.7, respectivamente. En todos estos casos se superó estadísticamente al testigo (6.6-7.9 Cprm,  $p=0.05$ ). En general, *Trichoderma* sp. y Microorganismos fueron los más consistentes en su capacidad de inhibición de los tres fitopatógenos.

**Palabras clave:** Hortalizas, hongos fitopatógenos del suelo, biofungicidas, control químico.

El estado de Guanajuato cuenta con un potencial hortícola excepcional; se encuentra dentro de los primeros lugares en producción de 70 especies de importancia agrícola, entre las que destacan cultivos hortofrutícolas como ajo (*Allium sativum* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (SIAP, 2013).

Las enfermedades constituyen uno de los factores de mayor riesgo para la producción de las hortalizas. En los últimos años, las enfermedades fúngicas han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción de diferentes especies hortícolas en México y en el mundo (Fisher *et al.*, 2012). Estas se han incrementado en las zonas productoras del país, siendo el Bajío una de las zonas de mayor incidencia de enfermedades de origen fúngico (Montes *et al.*, 2003).

*harzianum* (Biotricho-H), with a Mrgr of 1.48, 1.56, 2.35 and 2.53, respectively. For *S. cepivorum*, the best management was obtained with *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis), *T. harzianum* (Natucontrol) and Microorganisms (BPG-plus), with a Mrgr of 1.03, 1.73, 2.55 and 2.70, respectively. In summary, *Trichoderma* sp. and Microorganisms were the most consistent in their ability to inhibit the three pathogens.

**Key words:** Vegetables, soil borne fungi, biofungicides, chemical control.

The state of Guanajuato has an exceptional potential for horticulture; it is among the first places in the production of 70 species of agricultural importance, some of the most outstanding of which include garlic (*Allium sativum* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.) (SIAP, 2013).

Diseases are one of the most risk factors for the production of vegetables. In recent years, fungal diseases have caused major economic losses in the production of different vegetable species in Mexico and the rest of the world (Fisher *et al.*, 2012). These have increased in the productive areas of the country, with Bajío as one of the zones with the highest incidence of fungal diseases (Montes *et al.*, 2003).

The resistance structures of some phytopathogenic soil fungi, such as sclerotia, can remain viable in the soil for over 20 years, such as in the case of *S. cepivorum* (Pérez *et al.*, 2009), originating different space and time distribution patterns as a product of reincorporation of the sclerotia and remains of diseased plants due to inadequate cultural practices carried out by farmers, as well as by natural processes. In this way, the inocula of *S. cepivorum* Berk., *S. sclerotiorum*, and *S. minor* can be scattered in the fields and

Las estructuras de resistencia de algunos hongos fitopatógenos del suelo, como los esclerocios, pueden permanecer viables en el suelo por más de 20 años, como es el caso de *S. cepivorum* (Pérez *et al.*, 2009), originando diferentes patrones de distribución espacio-temporal, producto de la reincorporación de los esclerocios y restos de plantas enfermas por las prácticas culturales inadecuadas realizadas por los agricultores, y de igual forma por procesos naturales. De esta forma, el inóculo de *S. cepivorum* Berk., *S. sclerotiorum* y *S. minor*, puede ser dispersado en los campos de producción y permanecer latente dentro de los terrenos agrícolas, dificultando el manejo de las enfermedades (Adams y Papavizas, 1986; Ibarra *et al.*, 2010).

La mayoría de los agricultores utilizan los fungicidas como método de control de enfermedades; sin embargo, el uso excesivo puede inducir el desarrollo de resistencia en los patógenos, a la vez que se generan residuos tóxicos en alimentos y medio ambiente, poniendo en riesgo la salud humana (Fisher *et al.*, 2012); ésto ha llevado a la búsqueda de nuevos fungicidas, que en algunos casos se encuentran en otros organismos (biofungicidas) (Angulo *et al.*, 2009). El control biológico (CB) de fitopatógenos se presenta como una alternativa eficaz, económica y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso indiscriminado de agroquímicos (Agrios, 2005). La mayoría de los agentes antagonistas utilizados en control biológico son saprófitos debido a su facilidad de adaptación al medio y a su alta capacidad de competencia por nutrientes frente a otros organismos (Nelson, 1991; Michel *et al.*, 2009).

Con base en la problemática antes descrita, se planteó como objetivo determinar la sensibilidad *in vitro* a agentes de control biológico y fungicidas de aislados de *S. minor*, *S. sclerotiorum*, y *S. cepivorum* en cultivos de ajo, frijol, lechuga, papa y radicchio.

remain latent in them, making disease control more difficult (Adams and Papavizas, 1986; Ibarra *et al.*, 2010).

Most farmers use fungicides as a disease control method, although its excessive use may lead to resistance in the pathogens, while generating toxic residues in foods and the environment, thus becoming a risk to human health (Fisher *et al.*, 2012); this has led to a search for new fungicides, which, in some cases, are found in other organisms (biofungicides) (Angulo *et al.*, 2009). Biological control (BC) of phytopathogens presents itself as an efficient and affordable alternative, as well as risk-free in the face of numerous and increasing problems deriving from the excessive use agrochemicals (Agrios, 2005). Most antagonistic agents used in biological control are asprophytes, due to their adaptability to the surroundings, and their high capability of competition for nutrients with other organisms (Nelson, 1991; Michel *et al.*, 2009).

Based on the problem described above, the aim of this work was to determine the *in vitro* sensibility to biological control agents and isolated fungicides of *S. minor*, *S. sclerotiorum*, and *S. cepivorum* in plantations of garlic, bean, lettuce, potato, and radicchio.

The investigation was carried out in commercial vegetable fields in the state of Guanajuato and in the Plant Pathology Lab of the Life Sciences Division of the Irapuato-Salamanca Campus of the University of Guanajuato.

**Obtaining isolates.** *S. minor* was isolated from symptomatic lettuce (*L. sativa*) plants in San Miguel de Allende and Salamanca counties, Guanajuato; *S. sclerotiorum* was isolated from symptomatic lettuce (*L. sativa*) plants in Salamanca and Irapuato counties, Guanajuato; radicchio (*Cichorium intybus*) in Celaya municipality, Guanajuato;

La investigación se realizó en campos de producción comercial de hortalizas del estado de Guanajuato y en el laboratorio de Fitopatología de la División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato.

**Obtención de aislados.** *S. minor* se aisló de plantas sintomáticas de lechuga (*L. sativa*) de San Miguel de Allende y de Salamanca, Gto., *S. sclerotiorum* se aisló de plantas sintomáticas de lechuga (*L. sativa*) en Salamanca e Irapuato, de radicchio (*Cichorium intybus*) en Celaya, de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Guasave, y de papa (*S. tuberosum*) en Tangamandapio. Finalmente, *S. cepivorum* se aisló de plantas sintomáticas de ajo (*A. sativum*) de Salamanca, Gto., y de Córdoba, España.

De cada aislado se tomaron esclerocios y parte de tejido que presentó síntomas de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 %, y se cultivaron en Papa Dextrosa Agar (PDA) durante ocho días a 20±2 °C para *S. minor*; y a temperatura ambiente de laboratorio para *S. sclerotiorum* y *S. cepivorum*.

**Agentes de control biológico y fungicidas.** Los agentes de control biológico y fungicidas que se evaluaron (Cuadros 1, 2 y 3) se aplicaron con base en las recomendaciones comerciales.

**Sensibilidad *in vitro* y evaluación de productos biológicos y fungicidas.** Se pesaron y midieron las dosis recomendadas comercialmente de los productos biológicos y fungicidas a evaluar para ser agregados al agar y posteriormente se vació en cajas Petri. Al solidificar el agar, se colocaron en el centro de la caja discos de un centímetro de diámetro de la periferia de las colonias obtenidas de cada aislado y se incubaron a 20±2 °C.

bean (*Phaseolus vulgaris*) in Guasave county, Sinaloa; and potato (*S. tuberosum*) in Santiago Tangamandapio municipality, Michoacán. Finally, *S. cepivorum* was isolated from symptomatic garlic plants (*A. sativum*) in Salamanca county, Guanajuato, and in Cordoba, Spain.

From each isolate, sclerotia were taken, along with part of the tissue that displayed symptoms of the disease; they were disinfected with sodium hypochlorite at 1%, and then planted in Potato Dextrose Agar (PDA) for eight days at 20±2 °C for *S. minor*; and at room temperature for *S. sclerotiorum* and *S. cepivorum*.

**Biological control agents and fungicides.** Biological control agents and fungicides evaluated (Tables 1, 2 and 3) were applied based on commercial recommendations.

***In vitro* sensibility and evaluation of biological products and fungicides.** We weighed the commercially recommended doses of the biological products and fungicides to be evaluated and added to the agar, then poured into Petri dishes. When the agar solidified, disks, 1 cm in diameter were placed in the center of the dish from the periphery of the colonies obtained from each isolation and incubated at 20±2°C.

**Evaluation of mycelium growth.** The colony diameter was measured in two directions – the longest and shortest length – and mycelial growth was obtained as the average of both values in the directions at 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 268 hours after placing the disk with the fungi on the edge of each Petri dish in each of the three treatment repetitions (Pérez *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2009).

**Cuadro 1.** Crecimiento promedio radial micelial (Cprm) *in vitro* de dos aislados de *S. minor*, obtenidos del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) con respecto a 24 tratamientos de productos de control biológicos (16) y fungicidas (8).

**Table 1.** *In vitro* Mycelial radial average growth (Mrag) of two *S. minor* isolates obtained from lettuce (*L. sativa*) with regard to 24 treatments with biological control products (16) and fungicides (8).

| No. | Nombre común                                                        | Nombre comercial  | Cprm (cm)           |         |          |         |         |         |
|-----|---------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|---------|----------|---------|---------|---------|
|     |                                                                     |                   | 24 h                | 72 h    | 144 h    | 192 h   | 240 h   | 264 h   |
| 1   | Dicloran                                                            | Botran            | 1.00 a <sup>x</sup> | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 2   | Benomilo                                                            | Blindaje 50       | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 3   | Boscalid                                                            | Cabrio            | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 4   | Iprodione                                                           | Rovral            | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 5   | Clorotalonil-Cymoxanil                                              | Strike            | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 6   | Ciprodinilo-Fludioxonilo                                            | Swish             | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 7   | Tebuconazole                                                        | Tebucur           | 1.00 a              | 1.00 a  | 1.00 a   | 1.00 a  | 1.00 a  | 1.00 a  |
| 8   | Clorotalonil                                                        | Trevanil          | 1.00 a              | 1.30abc | 1.53abc  | 1.53ab  | 1.53 a  | 1.53 a  |
| 9   | <i>A. viridis</i> , <i>B. subtilis</i> ,<br><i>Streptomyces</i> sp. | Baktillis         | 1.00 a              | 1.73 cd | 3.33 d   | 4.43de  | 5.63 de | 6.00 de |
| 10  | Microorganismos                                                     | BPG-Plus          | 1.00 a              | 1.16 ab | 1.16 a   | 1.16ab  | 1.16 a  | 1.16 a  |
| 11  | <i>Trichoderma</i> sp.                                              | Trichoderma       | 1.00 a              | 1.31abc | 1.31 ab  | 1.31ab  | 1.31 a  | 1.31 a  |
| 12  | <i>Bacillus</i> sp., <i>Glomus</i> sp.                              | Soil cure         | 1.01 ab             | 2.78 fg | 5.01 fg  | 5.93 g  | 6.55efg | 6.71efg |
| 13  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Serenade Max      | 1.03abc             | 1.10 ab | 1.36abc  | 1.55ab  | 1.75 a  | 1.85 a  |
| 14  | <i>T. viride</i>                                                    | Esporalis         | 1.06 abcd           | 1.08 ab | 1.21 a   | 1.36ab  | 1.46 a  | 1.51 a  |
| 15  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Bacillus subtilis | 1.08 abcd           | 1.58bcd | 1.93 bc  | 2.60 c  | 3.35 b  | 3.70 b  |
| 16  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Natucontrol       | 1.10 abcd           | 1.88 de | 2.03 c   | 2.03bc  | 2.03 a  | 2.03 a  |
| 17  | Testigo                                                             | Testigo           | 1.10 abcd           | 2.01 de | 4.43 ef  | 5.93 g  | 7.30 fg | 7.86 h  |
| 18  | <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>        | Rhizobac combi    | 1.13 abcd           | 1.95 de | 3.00 d   | 3.65 d  | 4.26 bc | 4.66 bc |
| 19  | <i>S. lydicus</i>                                                   | Actinovate        | 1.16bcd             | 2.26 ef | 4.23 e   | 5.41 fg | 6.26 ef | 6.56 ef |
| 20  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Natu bac-s        | 1.16bcd             | 3.61 h  | 6.05 h   | 6.90 h  | 7.41 g  | 7.61fgh |
| 21  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Triko root        | 1.18 cd             | 2.06 de | 3.18 d   | 4.01de  | 4.91 cd | 5.36 cd |
| 22  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Biotricho-H       | 1.20 d              | 3.00 g  | 4.38 ef  | 4.83 ef | 4.90 cd | 4.90 c  |
| 23  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Probacil          | 1.20 d              | 2.73 fg | 5.16 g   | 6.31gh  | 7.26 fg | 7.55fgh |
| 24  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Probac bs         | 1.21 d              | 2.36 ef | 4.85 efg | 6.23gh  | 7.31 fg | 7.68 gh |
| 25  | <i>G. virens</i>                                                    | Soil gard         | 1.56 e              | 8.25 i  | 8.50 i   | 8.50 i  | 8.50 h  | 8.50 h  |

<sup>x</sup> Cada valor representa el promedio de dos aislados. Valores en cada columna con letras diferentes, son estadísticamente diferentes. Comparación Múltiple de Medias DSH Tukey  $P \leq 0.05$  / Each value represents the average of both isolates. Values in each column with different letters are statistically different. Multiple comparison of averages DSH Tukey  $P \leq 0.05$ .

**Evaluación del crecimiento del micelio.** Se midió el diámetro de la colonia en dos direcciones, en la mayor y menor longitud, y el crecimiento micelial se obtuvo como el promedio de los valores en las dos direcciones a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 268 horas, posteriores a la colocación del disco con el hongo en el centro de cada caja Petri en cada una de las tres repeticiones de

**Statistical analysis.** In the three experiments, a split plot experimental design was used, with a factorial arrangement correction with three repetitions. In each experiment there was a factorial arrangement: factor A was assigned to fungal isolations, which had two, five, and two levels; factor B was assigned to the biological control agents and fungicides, which had 25 levels. This gave a total of 50,

**Cuadro 2.** Crecimiento promedio radial micelial (Cprm) *in vitro* de cinco aislados de *S. sclerotiorum*, obtenidos de los cultivos de lechuga (*L. sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), papa (*Solanum tuberosum*) y radicchio (*Cichorium* sp) con respecto a 24 tratamientos de productos biológicos (16) y fungicidas (8).

**Table 2.** *In vitro* Mycelial radial average growth (Mrag) of five *S. sclerotiorum* isolates, obtained from lettuce (*L. sativa*), bean (*P. vulgaris*), potato (*S. tuberosum*), and radicchio (*Cichorium* sp) plants with regard to 24 treatments with biological control products (16) and fungicides (8).

| No. | Nombre común                                                        | Nombre comercial  | Cprm (cm)           |           |           |           |           |           |          |
|-----|---------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|     |                                                                     |                   | 24 horas            | 72 horas  | 120 horas | 192 horas | 240 horas | 264 horas |          |
| 1   | Dicloran                                                            | Botran            | 1.00 a <sup>x</sup> | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a   |
| 2   | Benomilo                                                            | Blindaje 50       | 1.00 a              | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a   |
| 3   | Ciprodinilo-Fludioxonilo                                            | Swish             | 1.00 a              | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a   |
| 4   | Tebuconazole                                                        | Tebucur           | 1.00 a              | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a   |
| 5   | Clortalonil-Cymoxanil                                               | Strike            | 1.02 a              | 1.16 a    | 1.28 ab   | 1.38 ab   | 1.42 ab   | 1.42 ab   | 1.42 ab  |
| 6   | Clortalonil                                                         | Trevanil          | 1.04 ab             | 1.23 ab   | 1.38 ab   | 1.55 abc  | 1.80 abc  | 1.94 abc  | 1.94 abc |
| 7   | Iprodione                                                           | Rovral            | 1.05 ab             | 1.30 ab   | 1.43 abc  | 1.86 abc  | 2.12 bc   | 2.24 bc   | 2.24 bc  |
| 8   | Boscalid                                                            | Cabrio            | 1.06 abc            | 1.30 ab   | 1.47 abc  | 1.49 abc  | 1.50 abc  | 1.50 abc  | 1.50 abc |
| 9   | <i>Trichoderma</i> sp.                                              | Trichoderma       | 1.04 ab             | 1.44 abc  | 1.48 abc  | 1.48 abc  | 1.48 abc  | 1.48 abc  | 1.48 abc |
| 10  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Natucontrol       | 1.08 abcd           | 1.49 abc  | 1.56 abc  | 1.56 abc  | 1.56 abc  | 1.56 abc  | 1.56 abc |
| 11  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Serenade Max      | 1.10 abcd           | 2.12 cde  | 2.84 d    | 3.56 d    | 3.96 e    | 4.01 e    | 4.01 e   |
| 12  | <i>Bacillus</i> sp., <i>Glomus</i> sp.                              | Soil cure         | 1.13 abcd           | 2.97 fgh  | 4.38 ef   | 5.49 efg  | 5.78 fgh  | 5.86 fg   | 5.86 fg  |
| 13  | <i>T. viride</i>                                                    | Esporalis         | 1.14abcde           | 2.62 defg | 3.38 de   | 3.48 d    | 3.49 de   | 3.49 de   | 3.49 de  |
| 14  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Natu bac-s        | 1.15abcde           | 2.83 efgh | 4.46 ef   | 5.67 efgh | 6.06 fghi | 6.06 fgh  | 6.06 fgh |
| 15  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Biotricho-H       | 1.18abcde           | 2.02 bcd  | 2.53 cd   | 2.53 cd   | 2.53 cd   | 2.53 cd   | 2.53 cd  |
| 16  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Bacillus subtilis | 1.25 bcdef          | 3.36 ghi  | 5.12 fg   | 5.80 efgh | 6.04 fghi | 6.08 fgh  | 6.08 fgh |
| 17  | Microorganismos                                                     | BPG-Plus          | 1.27 cdefg          | 2.11 cde  | 2.34 bcd  | 2.35 bc   | 2.35 bc   | 2.35 bc   | 2.35 bc  |
| 18  | <i>A. viridis</i> , <i>B. subtilis</i> ,<br><i>Streptomyces</i> sp. | Baktillis         | 1.28 cdefg          | 2.94 fgh  | 4.36 ef   | 5.22 ef   | 5.46 f    | 5.52 f    | 5.52 f   |
| 19  | <i>G. virens</i>                                                    | Soil gard         | 1.29defg            | 4.70 j    | 6.04 g    | 6.67 h    | 6.79 hi   | 6.80 gh   | 6.80 gh  |
| 20  | <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>        | Rhizobac combi    | 1.36 efg            | 3.27 gh   | 4.36 ef   | 5.16 ef   | 5.60 fg   | 5.81 fg   | 5.81 fg  |
| 21  | Testigo                                                             | Testigo           | 1.40 fgh            | 3.54 hi   | 5.02 fg   | 6.03 fgh  | 6.42 fghi | 6.56 fgh  | 6.56 fgh |
| 22  | <i>S. lydicus</i>                                                   | Actinovate        | 1.43 fgh            | 4.85 j    | 5.72 g    | 6.14 fgh  | 6.29 fghi | 6.32 fgh  | 6.32 fgh |
| 23  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Probacil          | 1.48 gh             | 2.37 def  | 3.40 de   | 4.92 e    | 5.56 fg   | 5.74 fg   | 5.74 fg  |
| 24  | <i>T. harzianum</i>                                                 | Triko root        | 1.48 gh             | 3.44 hi   | 5.24 fg   | 6.31 gh   | 6.89 i    | 7.12 h    | 7.12 h   |
| 25  | <i>B. subtilis</i>                                                  | Probac bs         | 1.60 h              | 4.14 ij   | 5.40 fg   | 6.18 fgh  | 6.62 ghi  | 6.79 gh   | 6.79 gh  |

\*Cada valor representa el promedio de dos aislados. Valores en cada columna con letras diferentes, son estadísticamente diferentes. Comparación Múltiple de Medias DSH Tukey  $P \leq 0.05$  / Each value represents the average of two isolates. Values in each column with different letters are statistically different. Multiple. Comparison of averages DSH Tukey  $P \leq 0.05$ .

cada tratamiento (Pérez *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2009).

**Análisis estadístico.** En los tres experimentos se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo factorial, con tres repeticiones. En cada experimento se tuvo un arreglo factorial, el factor A correspondió a los aislados del hongo, los

125, and 50 treatments, respectively. In all three experiments, the multiple comparison of averages was carried out using Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

***Sclerotinia minor.*** The two isolates of *S. minor* were sensitive to seven of the eight fungicides (Dicloran, Benomyl, Boscalid, Iprodione, Tebuconazole, Cyprodinil-Fludioxonil, and

**Cuadro 3.** Crecimiento promedio radial micelial (Cprm) *in vitro* de dos aislados de *S. cepivorum* obtenidos del cultivo de ajo (*Allium sativum*) con 24 tratamientos de productos biológicos (16) y fungicidas (8).

**Table 3.** *In vitro* Mycelial radial average growth (Cprm) *in vitro* of two *S. cepivorum* isolates obtained from plantations of garlic (*A. sativum*) with 24 treatments of biological products (16) and fungicides (8).

| No. | Nombre común                                                     | Nombre comercial  | Cprm (cm) |            |           |           |           |           |
|-----|------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|     |                                                                  |                   | 24 horas  | 72 horas   | 144 horas | 192 horas | 240 horas | 264 horas |
| 1   | Dicloran                                                         | Botran            | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 2   | Benomilo                                                         | Blindaje 50       | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 3   | Boscalid                                                         | Cabrio            | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 4   | Iprodione                                                        | Rovral            | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 5   | Clorotalonil-Cymoxanil                                           | Strike            | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 6   | Ciprodinilo-Fludioxonilo                                         | Swish             | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 7   | Tebuconazole                                                     | Tebucur           | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 8   | Clorotalonil                                                     | Trevanil          | 1.00 a    | 1.00 a     | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    | 1.00 a    |
| 9   | <i>S. lydicus</i>                                                | Actinovate        | 1.00 a    | 2.51 def   | 5.33 f    | 6.70 fg   | 7.26 fg   | 7.68 hi   |
| 10  | <i>T. harzianum</i>                                              | Biotricho-H       | 1.00 a    | 2.55 ef    | 4.75 ef   | 4.75 cd   | 4.75 d    | 4.75 de   |
| 11  | <i>T. harzianum</i>                                              | Natucontrol       | 1.00 a    | 1.91 bc    | 2.55 bc   | 2.55 b    | 2.55 bc   | 2.55 b    |
| 12  | <i>Bacillus</i> sp., <i>Glomus</i> sp.                           | Soil cure         | 1.00 a    | 2.53 ef    | 6.68 gh   | 7.78 gh   | 8.31 gh   | 8.45 i    |
| 13  | <i>G. virens</i>                                                 | Soil gard         | 1.00 a    | 4.01 g     | 6.70 gh   | 7.88 gh   | 8.50 h    | 8.50 i    |
| 14  | <i>Trichoderma</i> sp.                                           | Trichoderma       | 1.00 a    | 1.03 a     | 1.03 a    | 1.03 a    | 1.03 a    | 1.03 a    |
| 15  | <i>A. viridis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Streptomyces</i> sp. | Baktillis         | 1.01 a    | 2.28 bcdef | 4.66 ef   | 5.88 ef   | 6.83 ef   | 7.23 gh   |
| 16  | Testigo                                                          | Testigo           | 1.01 a    | 2.86 f     | 5.43 f    | 6.30 ef   | 6.90 ef   | 7.06 gh   |
| 17  | <i>T. harzianum</i>                                              | Triko root        | 1.01 a    | 1.93 cd    | 3.98 de   | 4.96 cd   | 5.76 de   | 6.15 fg   |
| 18  | <i>B. subtilis</i>                                               | Natu bac-s        | 1.03 a    | 2.78 f     | 7.75 h    | 8.40 h    | 8.50 h    | 8.50 i    |
| 19  | <i>B. subtilis</i>                                               | Probac bs         | 1.05 ab   | 2.65 ef    | 4.71 ef   | 4.83 cd   | 4.83 d    | 4.83 de   |
| 20  | <i>B. subtilis</i>                                               | Bacillus subtilis | 1.06 ab   | 2.83 f     | 5.71 fg   | 6.35 ef   | 6.91 ef   | 7.15 gh   |
| 21  | <i>T. viride</i>                                                 | Esporalis         | 1.06 ab   | 1.73 b     | 1.73 ab   | 1.73 ab   | 1.73 ab   | 1.73 ab   |
| 22  | <i>B. subtilis</i>                                               | Probacil          | 1.06 ab   | 2.41 cdef  | 4.71 ef   | 5.33 cde  | 5.38 d    | 5.38 ef   |
| 23  | <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>     | Rhizobac combi    | 1.06 ab   | 2.06 bcde  | 3.43 cd   | 4.55 c    | 5.78 de   | 6.25 fg   |
| 24  | <i>B. subtilis</i>                                               | Serenade Max      | 1.13 bc   | 1.81 b     | 2.73 bc   | 2.93 b    | 3.43 c    | 3.76 cd   |
| 25  | Microorganismos                                                  | BPG-Plus          | 1.16 c    | 2.43 cdef  | 2.56 bc   | 2.63 b    | 2.68 bc   | 2.70 bc   |

\*Cada valor representa el promedio de dos aislados. Valores en cada columna con letras diferentes, son estadísticamente diferentes. Comparación Múltiple de Medias DSH Tukey  $P \leq 0.05$  / Each value represents the average of two isolates. Values in each column with different letters are statistically different. Multiple Comparison of averages DSH Tukey  $P \leq 0.05$ .

cuales tuvieron dos, cinco y dos niveles. Al factor B se le asignaron los agentes de control biológico y los fungicidas, el cual tuvo 25 niveles; lo anterior dio un total de 50, 125 y 50 tratamientos, respectivamente. En los tres experimentos, la comparación múltiple de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

**Sclerotinia minor.** Los dos aislados de *S. minor* fueron sensibles a siete de los ocho fungicidas,

Chlorothalonil), considering this as those which did not develop a mycelial radial average growth (Mrag), 264 hours after the confrontation (Table 1). The biological control agents with the greatest fungistatic effects towards *S. minor* isolates, that is, those which caused the least Mrag 264 hours after confrontation, were: Microorganismos (BPG-Plus), *Trichoderma* sp. (*Trichoderma*), *T. viride* (*Esporalis*) and *Bacillus subtilis* (*Serenade max*), with 1.16a, 1.31a, 1.51a, and 1.85a, respectively;

Dicloran, Benomilo, Boscalid, Iprodione, Tebuconazole, Ciprodinilo-Fludioxonilo y Clorotalonil, considerando esto como los que no desarrollaron crecimiento promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación (Cuadro 1). Los agentes de control biológico que tuvieron los mayores efectos fungistáticos hacia los aislados de *S. minor*, es decir, los que propiciaron los menores crecimientos promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación, fueron: Microorganismos (BPG-Plus), *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis) y *Bacillus subtilis* (Serenade max), con 1.16a, 1.31a, 1.51a, y 1.85a, respectivamente; en comparación con *Gliocadium virens* (Soil gard), *B. subtilis* (Probac bs), *Bacillus* sp.-*Glomus* sp. (Soil cure) y *B. subtilis* (Natubacs), con 8.50h, 7.68gh, 6.71efg, y 7.61fgh, respectivamente, los cuales tuvieron los menores o nulos efectos fungistáticos hacia los aislados (Cuadro 1).

***Sclerotinia sclerotiorum***. Los cinco aislados fueron sensibles a cuatro de los ocho fungicidas, Dicloran, Benomilo, Tebuconazole y Ciprodinilo-Fludioxonilo, es decir, los que no presentaron crecimiento promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación (Cuadro 2). Los agentes de control biológico que tuvieron los mayores efectos fungistáticos hacia los aislados, entendiendo esto como los que propiciaron los menores crecimientos promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación, fueron: *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *Trichoderma harzianum* (Natucontrol), Microorganismos (BPG-Plus) y *T. harzianum* (Biotricho-H), con 1.48abc, 1.56abc, 2.35bc, y 2.53cd, respectivamente; en comparación con *T. harzianum* (Triko root), *B. subtilis* (Probac bs), *G. virens* (Soil gard) y *Streptomyces lydicus* (Actinovate), con 7.12h, 6.79gh, 6.80gh, y 6.32fgh, respectivamente, los cua-

in comparison to *Gliocadium virens* (Soil gard), *B. subtilis* (Probac bs), *Bacillus* sp.-*Glomus* sp. (Soil cure) and *B. subtilis* (Natubacs), with 8.50h, 7.68gh, 6.71efg, and 7.61fgh, respectively, which had the lowest or null fungistatic effects towards the isolates (Table 1).

***Sclerotinia sclerotiorum***. The five isolates sensitive to four of the eight fungicides (Dicloran, Benomyl, Tebuconazole, and Cyprodinil-Fludioxonil) i.e., those which showed no Mrag 264 hours after confrontation (Table 2). The biological control agents that had the greatest fungistatic effects towards the isolates, understood as those which caused the lowest Mrag 264 hours after confrontation were *Trichoderma* sp. (Trichoderma), *Trichoderma harzianum* (Natucontrol), Microorganismos (BPG-Plus), and *T. harzianum* (Biotricho-H), with 1.48abc, 1.56abc, 2.35bc, and 2.53cd, respectively, in comparison with *T. harzianum* (Triko root), *B. subtilis* (Probac bs), *G. virens* (Soil gard), and *Streptomyces lydicus* (Actinovate), with 7.12h, 6.79gh, 6.80gh, and 6.32fgh, respectively, which had the lowest or null fungistatic effects towards the *S. sclerotiorum* isolates (Table 2).

***Sclerotium cepivorum***. Both isolates were sensitive to the eight fungicides (Dicloran, Benomyl, Boscalid, Iprodione, Chlorothalonil-Cymoxanil, Cyprodinil-Fludioxonil, Tebuconazole, and Clorotalonil), therefore they did not present Mrag 264 hours after confrontation (Table 3). The biological control agents that had a greater fungistatic effect on the *S. cepivorum*, which means that they caused the least Mrag 264 hours after confrontation, were *Trichoderma* sp., (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis), *T. harzianum* (Natucontrol), and Microorganismos (BPG-plus), with 1.03a, 1.73ab, 2.55b, and 2.70bc, respectively; in comparison with *G. virens* (Soil gard), *Bacillus* sp.-*Glomus* sp.



les tuvieron los menores o nulos efectos fungistáticos hacia los aislados de *S. sclerotiorum* (Cuadro 2).

***Sclerotium cepivorum*.** Los dos aislados fueron sensibles a los ocho fungicidas, Dicloran, Benomilo, Boscalid, Iprodione, Clorotalonil-Cymoxanil, Ciprodinilo-Fludioxonilo, Tebuconazole y Clorotalonil, por lo que no presentaron crecimiento promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación (Cuadro 3). Los agentes de control biológico que ejercieron un mayor efecto fungistático hacia los aislados de *S. cepivorum*, lo que significa que propiciaron los menores crecimientos promedio radial micelial (Cprm), a las 264 horas posteriores a la confrontación, fueron: *Trichoderma* sp., (Trichoderma), *T. viride* (Esporalis), *T. harzianum* (Natucontrol) y Microorganismos (BPG-plus), con 1.03a, 1.73ab, 2.55b, y 2.70bc, respectivamente; en comparación con *G. virens* (Soil gard), *Bacillus* sp.-*Glomus* sp. (Soil cure), y *B. subtilis* (Natubacs), con 8.50i, 8.45i, y 8.50i, respectivamente, los cuales causaron un menor o un nulo efecto fungistático hacia los aislados (Cuadro 3).

En el caso de *S. cepivorum* se encontró un comportamiento uniforme hacia los fungicidas Tebuconazole (Tebucur), Iprodione (Rovral), Dicloran (Botran), Benomilo (Blindaje 50), Boscalid (Cabrio), Clorotalonil (Trevanil), Clorotalonil+Cymoxanil (Strike) y Ciprodinilo+Fludioxonilo (Swish). Resultados contrastantes se encontraron en el comportamiento de *S. cepivorum* hacia los fungicidas, los cuales fueron los reportados por Pérez *et al.* (1997) y Pérez *et al.* (2009), quienes mostraron la presencia de variabilidad del patógeno hacia los fungicidas usados. Con relación a la respuesta de *S. cepivorum* hacia los agentes de control biológico evaluados, se encontró una gran variabilidad, observando que los productos biológicos a los cuales

(Soil cure), and *B. subtilis* (Natubacs), with 8.50i, 8.45i, and 8.50i, respectively, which led to a lower or null fungistatic effect on the isolates (Table 3).

A uniform behavior was found in *S. cepivorum* towards fungicides Tebuconazole (Tebucur), Iprodione (Rovral), Dicloran (Botran), Benomyl (Blindaje 50), Boscalid (Cabrio), Clorotalonil (Trevanil), Clorotalonil+Cymoxanil (Strike), and Ciprodinilo+Fludioxonilo (Swish). Contrasting results were found in the behavior of *S. cepivorum* towards the fungicides reported by Pérez *et al.* (1997) and Pérez *et al.* (2009), who showed the presence of variability of the pathogen towards the fungicides used. In relation to the response of *S. cepivorum* towards the biological control agents evaluated, a wide variability was found, observing that the biological products to which there was a higher sensitivity to *in vitro* were those formed with *Trichoderma* spp.; the cause of this greater beneficial effect may be the biocontrolling action of *Trichoderma* spp., in which there have been several forms of action described that regulate the development of phytopathogenic fungi. Among these, the main ones are the competition for space and nutrients, microparasitism and antibiosis, which have a direct action on the phytopathogenic fungi (Infante *et al.*, 2009); it is also known that *Trichoderma* spp. displays other mechanisms, the bioregulatory action of which is indirect, such as the biochemical defense mechanisms, that consist in the deactivation of enzymes of the phytopathogenic fungi during the infection process (Infante *et al.*, 2009); this could explain the high inhibitory percentage of mycelial growth of *S. cepivorum*. This suggests an alternative for the control of white rotting, as pointed out by Ulacio *et al.* (2011). The use of *T. harzianum* as an alternative of biological control in soils that display high densities of *S. cepivorum* inocula, requires

hubo una mayor sensibilidad *in vitro* fueron los que se formularon con *Trichoderma* spp., la causa de este mayor efecto benéfico pudiera ser la acción biocontroladora de *Trichoderma* spp., en la que se han descrito diferentes modos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009); además, se conoce que *Trichoderma* spp. presenta otros mecanismos, cuya acción bioreguladora es de forma indirecta, tales como los mecanismos de defensa bioquímicos, que consisten en la desactivación de enzimas de los hongos fitopatógenos durante el proceso de infección (Infante *et al.*, 2009); lo anterior puede explicar el alto porcentaje inhibitorio del crecimiento micelial de *S. cepivorum*. Esto sugiere una alternativa de control de la pudrición blanca, como ha sido señalado por Ulacio *et al.* (2011). El uso de *T. harzianum* como alternativa de control biológico en suelos que presentan elevadas densidades de inóculo de *S. cepivorum*, requiere de dosis altas del antagonista combinadas con otras alternativas de manejo para lograr el control eficiente de la enfermedad (Delgadillo *et al.*, 2002; Ulacio *et al.*, 2011).

Para *S. minor* y *S. sclerotiorum*, se encontró un comportamiento uniforme hacia la mayoría de los fungicidas y aislados evaluados. Los aislados de radicchio de Celaya y de lechuga de Irapuato crecieron en presencia de algunos fungicidas, en comparación con los demás aislados de ambos hongos que no lo hicieron, esto probablemente pudiera ser ocasionado por los tratamientos aplicados a los campos donde se obtuvieron los aislados, ya que son terrenos tratados con controladores biológicos y esto pudo ocasionar que los aislados tuvieran un crecimiento micelial más vigoroso con algunos de los fungicidas evaluados; algo que no se esperaba

high doses of the antagonist combined with other alternatives to achieve an efficient control of the disease (Delgadillo *et al.*, 2002; Ulacio *et al.*, 2011). A uniform response was found in *S. minor* and *S. sclerotiorum* towards most fungicides and isolates evaluated. The isolates of radicchio from Celaya and lettuce from Irapuato grew in the presence of some fungicides, in comparison to the other isolates of both fungi that did not, probably due to the treatments undergone by the fields the isolates were taken from, since these lands are treated with biological controllers, and this may have caused the isolates to have a more vigorous mycelial growth with some of the fungicides evaluated. Something that was unexpected in this study was that the isolates of *S. sclerotiorum* provenientes from Celaya and from Irapuato grew in the presence of Boscalid (Cabrio), which is a fungicide that belongs to the group of Carboxanilides, and Iprodione (Rovral), which belongs to the Dicarboximide, in which there was Mrag between 24 and 264 hours after confrontation; this is probably related, among other things, to the history of the fields the *S. sclerotiorum* isolates were obtained from, regarding the continuous use of fungicides for the control of root diseases in different crops (Pérez *et al.*, 2009). The insensitivity to Boscalid and Iprodione obtained in this study contrasts with the sensitivity reported by Tarazona (2009), who found that the Boscalid and Iprodione inhibited fungal growth by 100 %. The sensitivity presented by isolates *S. minor* and *S. sclerotiorum* towards Tebuconazole, which brought about an inhibitory effect of 100 %, coincides with reports by Pérez *et al.* (1997), who claim these were similar with *S. cepivorum*. The biological control agents which caused the most inhibition of mycelial growth in *S. minor* and *S. sclerotiorum* were those that contained the fungus *Trichoderma* spp. The results obtained in this study coincide with those by Villalta *et al.* (2012), who

en este estudio, fue que los aislados de *S. sclerotiorum* provenientes de Celaya y de Irapuato crecieron en presencia de Boscalid (Cabrio) que es un fungicida que pertenece al grupo de las Carboxanilidas y de Iprodione (Rovral) perteneciente al grupo de las Dicarboximidias, en los cuales se tuvo crecimiento promedio radial micelial (Cprm) desde las 24 hasta las 264 horas posterior a la confrontación; esto posiblemente se encuentra relacionado entre otras causas, con la historia de los campos de donde se obtuvieron los aislados de *S. sclerotiorum*, con respecto al uso continuo de fungicidas para el control de enfermedades radicales en diferentes cultivos (Pérez *et al.*, 2009). La insensibilidad a Boscalid e Iprodione obtenida en el presente estudio, contrasta con la sensibilidad reportada por Tarazona (2009), quien reportó que el Boscalid y el Iprodione inhibieron al 100 % el crecimiento de los hongos. La sensibilidad que presentaron los aislados *S. minor* y *S. sclerotiorum* a Tebuconazole, que propició un efecto inhibitorio del 100 %, coincide con lo reportado por Pérez *et al.* (1997) quienes encontraron resultados similares con *S. cepivorum*. Los agentes de control biológico con mayor poder inhibitorio del crecimiento micelial de *S. minor* y *S. sclerotiorum* fueron los que contenían al hongo *Trichoderma* spp. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Villalta *et al.* (2012), quienes reportan una cepa de *T. hamatum* con alto porcentaje inhibitorio del crecimiento de *S. minor*. En el caso de *B. subtilis* (Serenade max), no se tuvo un efecto favorable sobre *S. minor* y *S. sclerotiorum*, en comparación con el efecto favorable obtenido con *Trichoderma* spp., ya que *B. subtilis* (Serenade max) fue de los controladores biológicos con menor efecto fungistático hacia los aislados de *S. minor* y *S. sclerotiorum*. Éstos resultados contrastan con lo reportado por Tarazona (2009), quien señala que *B. subtilis* tuvo un mayor efecto controlador hacia los hongos fitopatógenos evaluados.

report a strain of *T. hamatum* with a high percentage of inhibition of the growth of *S. minor*. In the case of *B. subtilis* (Serenade max), there were no favorable effects on *S. minor* and *S. sclerotiorum*, in comparison with the favorable effect obtained with *Trichoderma* spp., since *B. subtilis* (Serenade max) was one of the biological control agents with the lowest fungistatic effect on the *S. minor* and *S. sclerotiorum* isolates. These results contrast with those reported by Tarazona (2009), who points out that *B. subtilis* had a greater controlling effect towards the phytopathogenic fungi analyzed.

~~~~~End of the English version~~~~~

LITERATURA CITADA

- Adams PB and Papavizas GC. 1986. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. *Phytopathology* 61:1253-1256.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic. University of Florida. Florida United States of America. 948p.
- Angulo EMA, Armenta RE, García ERS, Carrillo FJA, Salazar VE y Valdez TJB. 2009. Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc., con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fito patología* 27:84-92.
- Delgado SF, Zavaleta ME, Osada KS, Arévalo VA, González HVA, Nieto AD y Torres PI. 2002. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:349-354.
- Fisher MC, Henk, DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL and Gurr SJ. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484:186-194. doi:10.1038/nature10947
- Infante D, Martínez B, González N, y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal* 24 (1):14-21.
- Ibarra MVA, Ferrera CR, Alarcón A, Lara HME, Valdez CJM. 2010. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista Mexicana de Micología* 31:53-63.
- Michel A AC, Otero S MA, Solano P LY, Ariza F R, Barrios A A y Rebolledo M A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp; de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum*

- Schlecht., agentes causales de la “escoba de bruja” del mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:18-26.
- Montes BBR, Nava JRA, Flores MHE y Mundo OM. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:300-303.
- Nelson EB. 1991. *Handbook of Applied Mycology*. pp. 327-355. In: Arora DK, Rai B, Mukerji KG, and Knudsen GR (eds.). *Current limits to biological control of fungal phytopathogens. Volume 1: Soil and Plants*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800p.
- Pérez ML, Olalde PV, Sánchez PJR, Castañeda CC y Entwistle AR. 1997. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 15:9-14.
- Pérez ML, Villalpando MJJ, Castañeda CC y Ramírez MR. 2009. Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:11-17.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. Avance de siembras y cosechas. Resumen Nacional por producto, Otoño –Invierno 2012 de riego y temporal. www.siap.gob.mx/index (consulta, julio 2014).
- Tarazona MLS. 2009. Control biológico y químico de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en alcachofa (*Cynara scolymus* L.). Tesis de Maestría, Especialidad de Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 98p.
- Ulacio D, Jiménez MA y Perdomo W. 2011. Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* Berk., y la pudrición blanca del ajo en Carache, estado Trujillo, Venezuela. *Bioagro* 23:105-114.
- Villalta ON, Wite D, Hunt J, Stewart A and Porter IJ. 2012. Biological control of sclerotinia minor on lettuce using trichoderma and coniothyrium species. *Acta Horticulturae* 944:51-58.