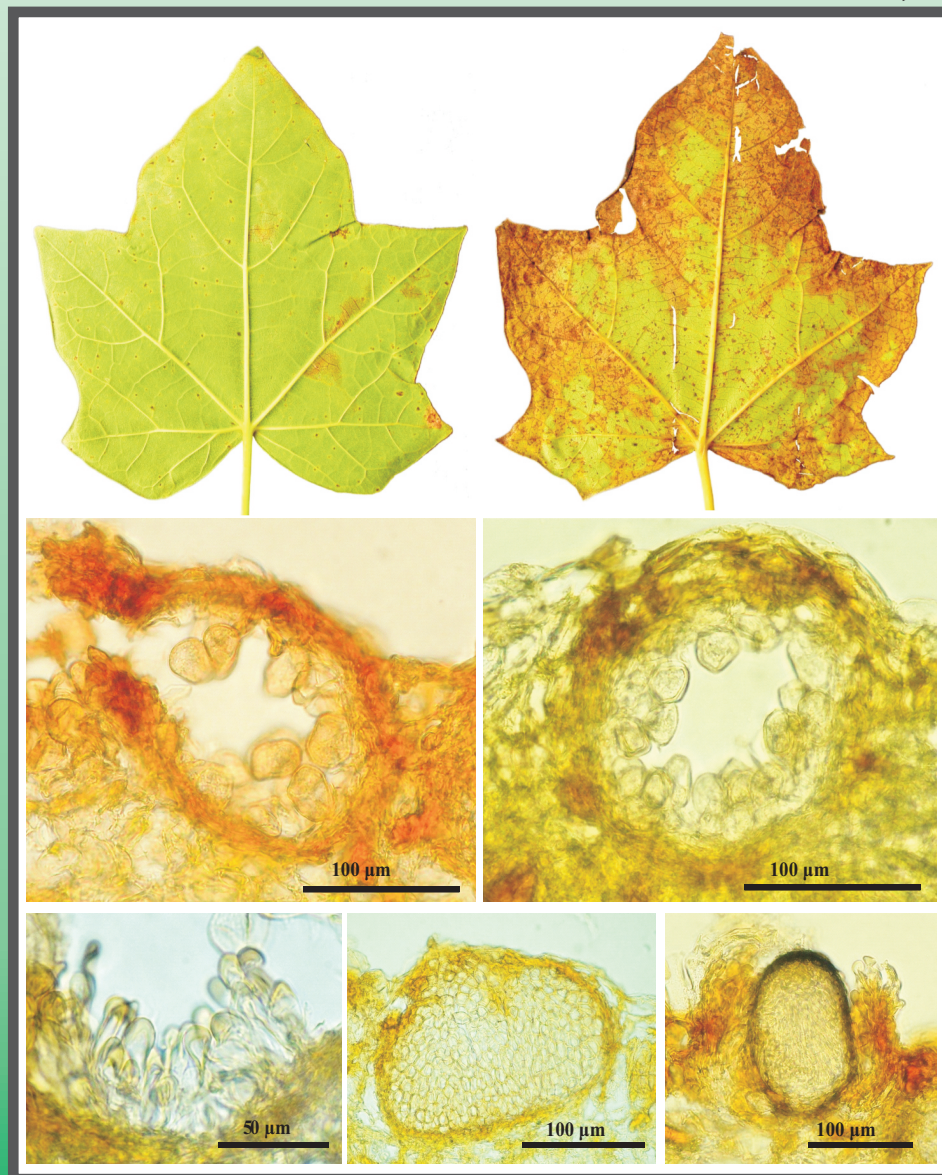


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 31 NÚMERO 1, 2013



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. Ivonne Aracely Sáenz Ortega. RMF

Editoras(es) Adjuntos (Senior Editors)

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía UMSNH
Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro CIAD
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada CIAD
Dr. Guillermo Fuentes Dávila INIFAP
Dr. Ángel Rebollar Alviter Universidad Autónoma Chapingo

Comité Editorial Internacional (International Editorial Advisory Board)

Dra. Liliana Aragón Caballero Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú
Dra. Anna Maselli Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela
Dr. R. Kenneth Horst Cornell University, USA
Dr. Eduardo R. French Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú
Dr. Rodrigo Valverde Louisiana State University, USA
Dr. Charles L. Wilson USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA
Dr. André Lévesque Agriculture and Agri-Food, Canada
Dr. Rafael M. Jiménez Díaz Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España
Dr. Terence L. Robinson Cornell University, USA
Dr. Kenneth Evans Rothamsted Research, UK
Dr. Louis K. Prom USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA
Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana Auburn University, USA
Dr. Sami Jorge Michereff Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Editoras(es) Asociados (Associate Editors)

Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas Colegio de Postgraduados
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro CIAD
M. en C. Dora Elia Hernández Narváez ITESM
Dr. Enrique González Pérez Colegio de Postgraduados
Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz UNAM, México
Dr. Guillermo Fuentes Dávila INIFAP
Dr. Lorenzo Guevara Instituto Tecnológico de Celaya
Dr. Ramón Villanueva Arce IPN
Dr. Ángel Rebollar Alviter Universidad Autónoma Chapingo

La Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN-0185-3309) está incluida en ISI-Thomson Scientific Master Journal List, REDALYC, LATINDEX, AGRIS, BIOSIS, PERIODICA, Review of Plant Pathology en Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACyT.

Política Editorial

La Revista Mexicana de Fitopatología (RMF) es una revista internacional que se publica semestralmente por la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF). Se distribuye a 61 bibliotecas dentro de México y 93 más en 57 países. Publica artículos de investigación original concernientes aspectos básicos y aplicados de fitopatología. Se incluyen tópicos generales relacionados con estudios de protección vegetal, así como de hongos, bacterias virus y nematodos fitopatógenos. Artículos de revisión, notas fitopatológicas, descripción de variedades y cartas al editor, también pueden someterse para su publicación. Todos los manuscritos se deben preparar en español o en inglés y enviarse al Editor en Jefe. La guía para autores se encuentra en la página de la SMF (www.sociedadmexicanadefitopatologia.org) y aparecerá en el primer número de cada volumen. La comunicación será exclusivamente a través del autor para correspondencia. Para su publicación, los escritos deberán ser revisados y aprobados por árbitros y editores especializados. Los trabajos publicados aparecerán en español e inglés, sin costo por la traducción. El cargo de publicación por página es de \$500 pesos mexicanos. La página a color (una o varias fotos) tiene un costo de \$750 pesos mexicanos. El costo de sobretiros o separatas adicionales es de \$50 pesos mexicanos cada uno si se ordenan más de cinco y de \$70 menos de cinco (incluye envío por correo ordinario). La suscripción anual de la RMF es de \$600 pesos individual y de \$1,000 pesos para compañía, biblioteca o institución; para extranjeros es de US\$60 individual y US\$100 para compañía, biblioteca o institución, lo cual incluye costos de envío por correo aéreo. Los manuscritos o cualquier tipo de dibujos o fotografías sometidas a la RMF y aceptados para publicación serán propiedad de la SMF.

Editorial Policy

The Mexican Journal of Phytopathology (MJP) is an international journal published biannually by the Mexican Society of Phytopathology, AC [Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF)]. It is distributed to 61 libraries in Mexico and 93 more in 57 countries. It publishes original research studies concerning basic and applied aspects of plant pathology. General topics included are related to plant protection studies, as well as fungi, bacteria, viruses and pathogenic nematodes. Review articles, phytopathological notes, description of varieties and letters to the editor, may also be submitted for publication. All manuscripts should be prepared in English or Spanish and sent to Editor in Chief. The Author's Guide can be found on the SMF webpage (www.sociedadmexicanadefitopatologia.org) and will appear in the first issue of each volume. Communication will be exclusively through the corresponding author. For its publication, the manuscripts must be reviewed and approved by specialist reviewers and editors. Published papers will appear in Spanish and English at no cost for the translation. The publication charge per page is \$500 pesos. Color pages (one or more photos) cost \$750 pesos. The cost of additional reprints is \$50 pesos if you order more than five and \$70 pesos for less than five (includes shipping by regular mail). Annual subscription to the journal is \$600 pesos for individuals and \$1,000 pesos for companies, libraries or institutions; the charge to foreigners is USD\$60 for individuals and USD\$100 for companies, libraries or institutions, which includes airmail shipping. Manuscripts or any type of drawings, photographs or slides submitted to the MJP and accepted for publication are property of the SMF.

Correspondencia: Carretera México-Texcoco, km. 36.5, Montecillo, Texcoco, C.P. 56230, Edo. de México.
Teléfono/Fax: (595) 9520200; correo y página de la SMF: revmexfitopatologia@prodigy.net.mx,
<http://sociedadmexicanadefitopatologia.org/>

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGIA

Volumen 31, número 1, 2013

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Scientific articles)

Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del mango, con *Trichoderma* spp., en condiciones de campo {Biocontrol of "Witches' Broom" disease in mango with *Trichoderma* spp., under field conditions}. Michel Aceves AC, Otero Sánchez MA, Díaz Castro A, Martínez Rojero RD, Ariza Flores R y Barrios Ayala A. 1

Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate {Morphological and molecular identification of *Penicillium oxalicum* causing stem and fruit rot in tomato}. Allende Molar R, Picos Muñoz PA, Márquez Zequera I, Carrillo Fasio JA, García Estrada RS y León Félix J.

Detección por RT-PCR punto final y tiempo real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México {Detection of three citrus viroids species from Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico by conventional and real time RT-PCR}. Guerrero Gámez CE, Alvarado Gómez OG, Gutiérrez Mauleón H, Gozález Garza R, Álvarez Ojeda MG y Luna Rodríguez M.

Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su efecto en el pH {Contribution of beneficial microorganisms due to soil amendments of dried cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) residues and its effect on pH soil}. Rodríguez Millán KA, Monreal Vargas CT, Huerta Díaz J, Soria Colunga JC y Jarquín Gálvez R. 29

ARTÍCULOS DE REVISIÓN (Review articles)

La biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* {Polyamine biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*}. Roa Cordero MV y Rosas Quijano R. 45

NOTAS FITOPATOLÓGICAS (Phytopathological notes)

Influencia de tipos de estacas en la incidencia de pudriciones radicales de yuca (*Manihot esculenta*) {Influence of cuttings on root rot incidence in cassava (*Manihot esculenta*)}. Folgueras Montiel M, Rodríguez Morales S, Herrera Isla L y Sánchez Rodríguez R. 60

Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) {Effect of the azoxystrobin on *Moniliophthora roreri*, causal agent of frosty pod rot of cocoa (*Theobroma cacao*)}. Torres de la Cruz M, Ortíz García CF, Téliz Ortíz D, Mora Aguilera A y Nava Díaz C. 65

13 **Primer reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México** {First report of *Phakopsora arthuriana* on *Jatropha curcas* in Mexico}. Nolasco Guzmán V, Ayala Escobar V, Tovar Pedraza JM, Ríos López EG, Calyecac Cordero HG y Miranda Rangel A. 70

20 INFORMACIÓN PARA AUTORES

Guía para Autores
Guide for Authors

Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del Mango, con *Trichoderma* spp., en Condiciones de Campo

Biocontrol of "Witches' Broom" Disease in Mango with *Trichoderma* spp., Under Field Conditions

Alejandro Casimiro Michel Aceves, Marco Antonio Otero Sánchez, Antonio Díaz Castro, Rubén Darío Martínez Rojero, Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, Colonia Centro, Iguala, Guerrero. CP 40000, México; Rafael Ariza Flores, Aristeo Barrios Ayala, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero), Campo Experimental Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan km 2. Iguala, Guerrero, México. Correspondencia: amichelaceves@yahoo.com.mx

(Recibido: Agosto 31, 2012 Aceptado: Octubre 11, 2012)

Michel Aceves AC, Otero Sánchez MA, Díaz Castro A, Martínez Rojero RD, Ariza Flores R y Barrios Ayala A. 2013. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del mango, con *Trichoderma* spp., en condiciones de campo. Revista Mexicana de Fitopatología 31: 1-12.

Resumen. Se evaluó la efectividad biológica en campo de *Trichoderma* spp., en el control de la “escoba de bruja” del mango ocasionada por *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* en dos ciclos de producción en una huerta comercial de mango cv. “Haden” de 20 años de edad, en Tuxpan, Gro. Los tratamientos fueron: 1) *Trichoderma harzianum* cepa Thzn-2; 2) *T. harzianum* cepa Thzcf-12; 3) *T. lignorum*; 4) Benomilo; 5) Benzotiazol + Metileno bistiocionato y 6) testigo absoluto; se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar, con 5 repeticiones. Se realizaron ocho aspersiones aéreas, cada 15 d desde mediados de octubre. Las variables evaluadas fueron: 1) número de inflorescencias sanas y enfermas m² y por área de copa; 2), número total de frutos por árbol; 3), eficiencia productiva; y 4) severidad de la enfermedad. Se realizó un análisis de varianza, prueba de Tukey y contrastes ortogonales. *T. lignorum* y Thzn-2 presentaron la mayor cantidad de inflorescencias sanas, superando a los fungicidas químicos. La cantidad de frutos por árbol y la eficiencia productiva tendió a aumentar en el segundo año de evaluación en los tratamientos a base de *Trichoderma*. Con los dos años de evaluación consecutivos se comprobó que *Trichoderma* spp., es un buen agente de biocontrol. En particular, *Trichoderma harzianum* cepa Thzn-2 redujo la severidad en promedio 22.9 % comparado con el testigo.

Palabras clave adicionales: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, control biológico.

La superficie mundial cultivada con mango (*Mangifera indica* L.) en el 2011 alcanzó un total de 5,092,802 ha, con una producción de 35,124,127 t. El principal productor a

Abstract. The biological effectiveness was evaluated in field of *Trichoderma* spp., in the control of mango "witch's broom" caused by *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans* in two production cycles in a commercial mango orchard of 20 years cv. "Haden", in Tuxpan, Gro. The treatments were: 1) *Trichoderma harzianum* strain Thzn-2; 2) *T. harzianum* strain Thzcf-12; 3) *T. lignorum*; 4) Benomyl; 5) Benzothiazole + Methylene bistiocyanate and 6) absolute witness; they were distributed at random in a design of complete blocks, with 5 repetitions. They were carried out eight air aspersions, every 15 d from about the middle of October. The evaluated variables were: number of inflorescences healthy and disease m² and total area, total number of fruits for tree, productive efficiency and disease severity. It was carried out a variance analysis, test of Tukey and orthogonal contrasts. *T. lignorum* and Thzn-2 presented the biggest quantity in healthy inflorescences, over coming to the chemical fungicides. The quantity of fruits for tree and the productive efficiency spread to increase in the second year evaluation in the treatments with the help of *Trichoderma*. With the two serial years of evaluation was proven that *Trichoderma* spp., is a good biocontrol agent for the disease. In particular, *Trichoderma harzianum* native strain Thzn-2 reduced the severity on the average 22.9 % compared with the witness.

Additional keywords: *Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, biological control.

The total world area cultivated with mango (*Mangifera indica* L.) in 2011 reached 5,092,802 ha, with a total production of 35,124,127 t. The main global producer was India with a share of 46.3 % (2,356,700 ha) and it was followed by China with 9.2 % (466,637 ha), these two countries accounted for over 55 % of worldwide production. Mexico ranks sixth position as a producer of this fruit, right behind India, China, Thailand, Indonesia and Pakistan (FAO, 2012). Mango production in Mexico occupies an important place in the fruit farm industry of the country. In

nivel mundial fue la India con una participación de 46.3 % (2,356,700 ha), seguida por China con un 9.2 % (466,637 ha). Estos dos países representan más de 55% de la producción. México ocupa el sexto lugar como productor de esta fruta, después de India, China, Tailandia, Indonesia y Pakistán (FAO, 2012). La producción de mango en México ocupa un lugar preponderante en la explotación frutícola del país. En 2011 se cosecharon 174,969.85 ha con un rendimiento de 1,632,649.34 t y un valor en miles de pesos de 4,347,697.77. Los principales estados productores fueron: Sinaloa, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Veracruz y Michoacán, los cuales aportaron más del 60% de la producción nacional. El estado de Guerrero ocupa el tercer lugar a nivel nacional en la producción de mango. Las regiones productoras son: Costa grande, Costa chica, Tierra Caliente y Norte. En 2011 participó con una superficie cosechada de 24,658 ha y una producción de 13,473 t ha⁻¹ (SIAP, 2012). En la mayoría de las zonas productoras de mango en el mundo se presenta un problema fitosanitario denominado "escoba de bruja" (Kumar *et al.*, 1993), que en México se encuentra distribuida en todos los estados productores y puede reducir el 60 % o más del rendimiento. En casos de ataque severo, el daño puede considerarse del 100 % debido a que los árboles no producen fruta o ésta es abortada prematuramente por acción de la enfermedad. La región de Tierra Caliente y Norte son las más afectadas por la enfermedad y los cultivares Haden y criollo son los más susceptibles con una superficie de 2,804 ha (SIAP, 2012), donde provoca decrementos superiores al 60 % de la producción (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Ha existido controversia sobre la etiología de la enfermedad; sin embargo, las investigaciones señalan consistentemente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*, como los agentes causales de la enfermedad (Bhatnagar y Beniwal, 1977; Freeman *et al.*, 1999 y 2000). Además, en fechas recientes se han reportado dos nuevas especies, una de las cuales ha sido reportada como *Fusarium mangiferae*, relacionada con cepas que fueron previamente identificadas como *F. subglutinans*, y la otra como *Fusarium sterilihyphosum*, aislada únicamente de tejido malformado en Sudáfrica (Britz *et al.*, 2002). Incluso, algunos trabajos ya señalan a *F. mangiferae* como agente causal de este problema (Iqbal *et al.*, 2006). Para la región norte del estado de Guerrero, Noriega-Cantú *et al.* (1999), reportan las especies *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Estos hongos se han tratado de controlar; sin embargo, no existe un método único que logre disminuirlos significativamente, por lo que se ha propuesto el manejo integrado que incluye: poda fitosanitaria, fertilización al suelo y follaje, aspersiones de fungicidas, acariciadas, reguladores de crecimiento y otros compuestos. El uso descontrolado de fungicidas provoca contaminación ambiental y resistencia (De Waard *et al.*, 1993), por lo que se buscan alternativas compatibles con el ambiente. El método biológico con *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro* puede ser exitoso (Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2009). La efectividad para controlar un fitopatógeno *in vitro* e *in situ* por un antagonista puede variar en términos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (Dennis y Webster 1971a y

2011, 174,969.85 ha were harvested with a yield of 1,632,649.34 tons and worth of \$4,347,697.77 mexican pesos. The main producing states were: Sinaloa, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Veracruz and Michoacan, which accounted for over 60 % of the national production. Guerrero state ranks third nationally in mango production, its main growing regions are: Costa Grande, Costa Chica, Tierra Caliente and Norte; during 2011 it contributed with a harvested area of 24,658 ha and a production of 13,473 t ha⁻¹ (SIAP, 2012). In most mango producing areas in Mexico and worldwide, there is a phytosanitary problem known as "witches' broom" (Kumar *et al.*, 1993), which in Mexico is currently distributed in all producing states and in high incidence regions it can reduce up to 60 % or more of the yield, in cases of severe attack, the damage can be up to 100 % when the trees do not produce fruit or it is aborted prematurely because of the disease. Tierra Caliente and Norte regions are the most affected by the disease and Haden and Creole cultivars are the most susceptible with an area of 2,804 ha (SIAP, 2012), where it causes more than 60 % decreases in production (Noriega-Cantú *et al.*, 1999). There has been controversy about the etiology of the disease; however, researchers have shown consistently the presence of *Fusarium oxysporum* and *F. subglutinans* fungi as the causative agents of disease (Bhatnagar and Beniwal, 1977, Freeman *et al.*, 1999 and 2000). More over, recently two new species have been reported, *Fusarium mangiferae* (related to strains that were previously identified as *F. subglutinans*) and *Fusarium sterilihyphosum* (only isolated in malformed tissue in South Africa (Britz *et al.*, 2002)). Even some studies already point to *F. mangiferae* as the causal agent of this problem (Iqbal *et al.*, 2006). In the north region of Guerrero state, Noriega-Cantú *et al.* (1999) reported *Fusarium oxysporum* and *F. subglutinans* species. Although there have been several attempts to control these fungi, still there is no one single method that controls the disease by itself, but rather a series of steps that include: plant health pruning, soil and foliage fertilization, fungicides sprays, acaricides, growth regulator and other compounds; however, uncontrolled use of chemicals causes environmental pollution and resistance (De Waard *et al.*, 1993), therefore, there is a continuous search of environmentally friendly alternatives, where the biological *in vitro* method using *Trichoderma* spp. might be successful (Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2009). Effectiveness in controlling a pathogen under *in vitro* and *in situ* conditions by an antagonist may vary in terms of adaptation to a specific biotic and abiotic environment (Dennis and Webster 1971a and b), for that reason it is important to know the types of antagonism of biocontrol fungi to implement a good control strategy. *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent is effective against foliar (Nelson, 1991) and soil (Papavizas, 1981, 1985) pathogens, because of its ability to infect, compete for nutrients or produce compounds which are antagonistic to a variety of fungi of the genus *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella* and *Colletotrichum*, among others. Michel-Aceves *et al.* (2001, 2005a, 2005b, 2009) reported the *in vitro* antagonistic potential of native strains on the two

b) por tal motivo es importante el conocimiento de los tipos de antagonismo de hongos biocontroladores para implementar una buena estrategia de control. *Trichoderma* spp., como agente de biocontrol es eficaz contra fitopatógenos foliares (Nelson, 1991) y del suelo (Papavizas, 1981, 1985), por su capacidad de parasitar, competir por nutrientes o producir compuestos que resultan antagónicos para una gran variedad de hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, entre otros. Michel-Aceves *et al.* (2001, 2005a, 2005b, 2009) reportan el potencial antagónico *in vitro* de cepas nativas sobre las dos especies de *Fusarium* involucradas en la “escoba de bruja” del mango; sin embargo, se desconoce la efectividad que pueda ejercer en condiciones de campo, por lo que se requiere evaluar su potencial en huertos comerciales y utilizar más extensivamente el control biológico con agentes biocontroladores nativos. Considerando estos aspectos, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad que tiene *Trichoderma* spp., en el control de la enfermedad denominada “escoba de bruja” del mango, en dos años consecutivos de producción bajo condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La presente investigación se realizó durante 2009 y 2010 en una huerta comercial de mango var. Haden de 20 años de edad, ubicada en Tuxpan, Gro., de la región Norte del estado, localizada a 18° 27' LN y entre los 99° 42' LO a una altitud de 731 m. El clima predominante para esta zona, de acuerdo a la clasificación de Köpen modificado por García (1988), corresponde a: Awo (w) (i') g, clima cálido seco, el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 37 °C de abril a septiembre y temperatura promedio de octubre a marzo de 23 °C y una precipitación promedio anual de 960 mm. La dirección de los vientos son de la siguiente manera: En primavera de sur a norte; en invierno de suroeste al sureste; en verano de norte a sur y en otoño de sur a norte (Centro Nacional de Estudios Municipales, 1987; INEGI, 2005).

Microorganismos evaluados. Se utilizó la cepa Thzn-2 (*T. harzianum*), del cepario del Laboratorio de Fitopatología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, la cual se aisló del suelo de ésta misma huerta de mango y en el trabajo *in vitro* realizado por Michel-Aceves *et al.* (2009), fue la cepa que inhibió significativamente el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*; la cepa Thzcf-12 (*T. harzianum*), del cepario del laboratorio de control biológico de la Universidad de Colima, la cual se aisló en Armería, Colima y en el trabajo *in vitro* realizado por Michel-Aceves *et al.* (2005a y b), presentó efecto inhibitorio sobresaliente del crecimiento micelial sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*. La cepa *T. lignorum*, se obtuvo a partir del producto comercial MYCOBAC® (Laboratorios Buckman, S.A. de C.V.) a una concentración de 2×10^7 conidios viables g^{-1} , según su etiqueta y recomendación.

Fusarium species involved in the mango "witches' broom"; however, their effectiveness under field conditions is unknown, the refore, it is necessary to evaluate their potential in commercial orchards and to use more extensively the biological control with native biocontrol agents more antagonistic than those that currently exist. Considering these aspects, the aim of this study was to evaluate *Trichoderma* spp., effectiveness in controlling mango "witches' broom" disease, in two consecutive production years under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Study area. This research was carried out during 2009 and 2010 in a mango commercial orchard var. Haden of 20 years old, located in Tuxpan, Gro. (northern region of the state) at 18° 27' LN and 99° 42' LW; and 731 m altitude, the predominant climate for this area, according to Köpen classification modified by García (1988), corresponds to: Awo (w) (i') g, dry warm climate, the driest of the subhumids with summer rains, 37 °C average annual temperature from April to September, 23 °C average temperature from October to March and 960 mm average annual rain fall. The wind directions are as follows: In spring from south to north; in winter from south west to south east; in summer from north to south and during autumn from south to north (National Centre for Municipal Studies, 1987, INEGI, 2005).

Microorganisms evaluated. Thzn-2 (*T. harzianum*) strain was used from the strain collection of the Laboratory of Plant Pathology of the Agricultural College of the State of Guerrero, which was isolated from soil of this same mango orchard and from the *in vitro* work conducted by Michel-Aceves *et al.* (2009), as this was the strain that significantly inhibited mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. subglutinans*; Thzcf-12 (*T. harzianum*) strain, from the strain collection of biological control laboratory of the University of Colima, which was isolated in Armería, Colima, and in the *in vitro* work conducted by Michel-Aceves *et al.* (2005a and b), which showed a remarkable inhibitory effect on mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. subglutinans*. *T. lignorum* strain was obtained from MYCOBAC® commercial product (Buckman Laboratories, Inc.) at a concentration of 2×10^7 viable conidia g^{-1} , according to its label and recommendation.

Treatments and experimental design. *Trichoderma* genus was evaluated with three strains and two different species: native Thzn-2 (*T. harzianum*); Thzcf-12 (*T. harzianum*); commercial strain (*T. lignorum*, Mycobac®), two synthetic fungicides: Benomyl (BENLATE®) and Benzothiazole + Metylene bis-thiocyanate (BUSAN®) and the absolute control without any application of products, generating 6 treatments (Table 1), which were evaluated in two consecutive production cycles. The experimental design used was randomized complete block with five replicates, the experimental unit consisted of a mango tree 20 years old during floral differentiation stage. The eight applications of synthetic and biological products were directly applied to foliage and buds and they began one month before flowering (October 15) until the fruit set

Tratamientos y diseño experimental. Se evaluó el género *Trichoderma* con tres cepas y dos especies diferentes: Thzn-2 nativa (*T. harzianum*); Thzcf-12 (*T. harzianum*); cepa comercial (*T. lignorum*, i.a. del Mycobac®), dos fungicidas sintéticos Benomilo (BENLATE®) y Benzotiazol + Metilen bisticioanato (BUSAN®) y el testigo absoluto sin aplicación de productos, generándose 6 tratamientos (Cuadro 1), los cuales se evaluaron en dos ciclos de producción consecutivos. El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones, la unidad experimental estuvo formada por un árbol de mango de 20 años de edad y en etapa de diferenciación floral. Las ocho aplicaciones de los productos sintéticos y biológicos fueron al follaje y brotes, se iniciaron un mes antes de la floración (15 de Octubre) hasta el amarre del fruto (15 febrero), se realizaron cada 15 d, con una bomba aspersora de motor tipo parihuela (Swissmex-Rapid S.A. de C.V. México), con una capacidad de 100 L de agua; en todos los tratamientos se utilizó como coadyuvante y estabilizador del pH al producto AGREX-ABC® a una dosis de 2 mL L⁻¹. Los árboles se bañaban perfectamente con los productos sintéticos y biológicos hasta que empezaban a escurrir al suelo los productos.

Reproducción de *Trichodermas* nativos: Las cepas Thzn-2 y Thzcf-12 se reprodujeron en el laboratorio, para lo

(February 15), the applications were carried out every 15 d with a motor spray pump (litter type, Swissmex-Rapid SA de CV Mexico) of 100 liters capacity; in all treatments, an adjunct and pH stabilizer was used (AGREX-ABC®, 2 mL L⁻¹). The trees were completely covered with synthetic and biological products until the products drained to the ground.

Native *Trichodermas* reproduction. Thzn-2 and Thzcf-12 strains were reproduced in the laboratory, for this purpose small pieces (± 1.0 cm) of corn cobs as a substrate were used, which was previously washed and immersed for 45 min in a container with distilled water and the antibiotic chloramphenicol at a concentration of 500 ppm. After this time, the substrate was placed in a mesh to remove excess water by placing 300 g of substrate in polystyrene bags (23 x 33 cm), then they were tied and lastly autoclave sterilized for 30 min. Once the bags were cooled they were inoculated with 5 mL of a spore suspension at a concentration of 1×10^3 and incubated under laboratory conditions $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 40 % relative humidity and 12 h light / dark. Spore harvesting was done after 21 d of inoculation, adding 500 mL of sterile distilled water to each substrate bag in order to detach from the cob as many spores as possible and obtain a concentrated suspension (Arzate-Vega *et al.*, 2006). In the Neubauer Hematimetic chamber (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY) the spore concentration was counted and it was adjusted to 1×10^8

Cuadro 1. Tratamientos y dosis utilizadas en el control de la "Escoba de Bruja" del mango, Tuxpan, Gro., ciclo productivo 2009 y 2010.

Table 1. Treatments and doses used in the control of the mango "Witches Broom" disease, Tuxpan, Gro., 2009 and 2010 production cycles.

No.	Tratamientos	Dosis (100 L ⁻¹)
1	<i>T. harzianum</i> , cepa Thzn-2	1×10^8
2	<i>T. harzianum</i> , cepa Thzcf-12	1×10^8
3	<i>T. lignorum</i> (MYCOBAC®)	2×10^7
4	Benomilo (BENLATE®)	150 g ^z
5	Benzotiazol + Metilen bisticioanato (BUSAN®)	200 mL ^z
6	Testigo absoluto	Sin aplicación

^zProducto comercial.

cual se utilizó trozos pequeños (± 1.0 cm) de olote de maíz como sustrato, el cual fue previamente lavado y sumergido por 45 min en un recipiente con agua destilada y el antibiótico cloranfenicol a una concentración de 500 ppm. Después de este tiempo, el sustrato se depositó en una malla para eliminar el exceso de agua, colocando 300 g de sustrato en bolsas de poliestireno de 23 x 33 cm, fueron amarradas con liga y se procedió a su esterilización en autoclave por 30 min. Una vez frías las bolsas se inocularon con 5 mL de una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^3 e incubaron en condiciones de laboratorio $25^\circ\text{C} \pm 1$, 40 % de humedad relativa y 12 h luz/oscuridad. La cosecha de esporas se realizó a los 21 d después de haber inoculado, agregando a cada bolsa de sustrato 500 mL de agua destilada estéril, con la finalidad de desprender del olote la mayor

spore mL. The 1×10^8 concentration is optimal to have good biocontrol (Arzate-Vega *et al.*, 2006). The commercial strain (*T. lignorum*, Mycobac®) has a 2×10^7 concentration, which is lower; however, it is recommended by the manufacturer.

Agricultural management of the experimental lot. It is important to mention that this commercial orchard has no appropriate agronomic management, no chemical fertilizer application, minimum pests, diseases and weeds control and phytosanitary pruning are not performed. Therefore, in order to standardize the experimental lots, a management of the experimental lot was carried out a month before flowering which consisted of: A light pruning to remove plant inflorescences and vegetative branches affected by the "witches' broom" disease; a mechanized

cantidad de esporas y obtener una suspensión concentrada (Arzate-Vega *et al.*, 2006). En la cámara hematimétrica de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Islan, NY) se contabilizó la concentración de esporas y se ajustó a 1×10^8 esporas mL^{-1} . La concentración de 1×10^8 es óptima para ejercer un buen biocontrol (Arzate-Vega *et al.*, 2006). La cepa comercial (*T. lignorum*, i.a. del Mycobac®) viene a 2×10^7 que es una concentración menor; sin embargo, es la que recomienda la casa comercial.

Manejo Agronómico de lote experimental. La huerta comercial no tuvo un manejo agronómico adecuado; no hubo aplicación de fertilizante químico; tuvo escaso control de plagas, enfermedades y malezas no se realizaron podas fitosanitarias. Con la finalidad de uniformizar las unidades experimentales se realizó un manejo del lote experimental un mes antes de la floración que consistió en: Una ligera poda fitosanitaria para eliminar inflorescencias y ramas vegetativas afectadas por la “escoba de bruja”; control de malezas mecanizado mediante dos pasos de rastra; dos riegos, uno al amarre del fruto (15 de enero) y el otro 15 d después, para promover mejor amarre y desarrollo del fruto que son etapas críticas en la producción de mango; no se aplicó fertilizante químico, solo se incorporó materia orgánica (estiércol de bovino seco) a dosis de 10 kg árbol^{-1} ; no se utilizó ningún producto insecticida-acaricida o fungicida; y finalmente la cosecha se realizó a finales de mayo a principios de julio de cada año.

Variables de estudio: Número de inflorescencias sanas y enfermas por m^2 y totales. Para contabilizar las inflorescencias se utilizó un aro de 0.64 m^2 ; la copa del árbol se dividió en cuadrantes orientados a cada punto cardinal (N, S, E y O) el aro se colocaba sobre el árbol en cada punto cardinal y se contaban las inflorescencias sanas y enfermas (malformación floral) ubicadas dentro del aro. Finalmente se realizó el cálculo del área de la copa/ m^2 , para lo cual se midió el diámetro de copa de cada árbol con ayuda de una cinta métrica, esta se tomó de la sombra proyectada por el sol en el suelo a las 12:00 h, midiendo la parte más larga de la sombra y otra de la parte más angosta de la copa proyectada, obteniendo al final una media del diámetro en cada árbol muestreado; para estimar el número de inflorescencias sanas y enfermas por árbol se utilizó la siguiente fórmula: $(\pi \cdot r^2)$ y realizando los cálculos con reglas de tres para estimar el número por metro cuadrado y por área de copa de las inflorescencias (Westwood, 1982). Número total de frutos por árbol. En el momento de la cosecha se contaron todos los frutos por árbol. Eficiencia Productiva se midió en base al área transversal del tronco. Esta es la mejor forma para evaluar el efecto real de los tratamientos, ya que cada árbol es diferente a otro ya sea en vigor, tamaño de la copa, grosor, entre otros (Westwood, 1982). Para esto se midió la periferia del área del tronco en metros y se estimó el total de frutos en kilogramos producidos por biomasa utilizando la siguiente fórmula:

$$EP = \text{kg}/\text{árbol}/\text{ATT}$$

donde; EP = Eficiencia productiva, ATT = Área transversal del tronco en m^2 ($\pi \cdot r^2$). La periferia del área del tronco se midió con la ayuda de una cinta métrica a 0.50 m de la base

weed control by two dredge steps; two irrigations, first at fruit set (January 15th) and the other one 15 d later to promote a better set and fruit development which are critical stages in mango production; chemical fertilizer was not applied, only organic matter (dry cattle manure) was incorporated at 10 kg tree^{-1} doses; insecticides- acaricides or fungicides were not used, and finally the harvest took place in late May to early July each year.

Study variables: number of healthy and diseased inflorescences per m^2 and totals. In order to account for inflorescences, a ring of 0.64 m^2 was used; the tree crown was divided into quadrants facing each cardinal point (N, S, E and W), the ring was placed on the tree in each cardinal point and healthy and diseased (floral malformation) inflorescences located inside the ring were counted. Lastly, crown area / m^2 calculations were done and for this purpose the diameter of each tree crown was measured using a measuring tape, and this was taken from the shade projected by the sun on the ground at 12:00 h by measuring the longest part of the shade and the narrow west part of the crown projected, obtaining a mean diameter for each sampled tree; in order to estimate the number of healthy and diseased inflorescences per tree, the following formula was used: $(\pi \cdot r^2)$ and doing calculations with rules of three to estimate the number per square meter and per crown area of the inflorescences (Westwood, 1982).

Total number of fruits per tree. At harvest time all fruits per tree were counted.

Productive Efficiency. This is measured based on trunk's transversal area, as it is the best way to evaluate the actual effect of the treatments, as each tree is different to another either in force, crown size, thickness, etc. (Westwood, 1982). For this purpose, the periphery of trunk area in meters was measured, and the total number of fruits was estimated in kilograms produced by biomass using the following formula:

$$EP = \text{kg}/\text{tree}/\text{TCA}$$

Where: PE = Productive efficiency, TCA = Trunk Cross-sectional Area in m^2 ($\pi \cdot r^2$). The periphery of the trunk area was measured with the help of a measuring tape at 0.50 m above ground level (Westwood, 1982).

Disease severity. This was measured based on the total number of healthy and diseased inflorescences by the crown area of each tree, it was expressed in percentage.

Statistical analysis. The data obtained for each of the tests were subjected to variance analysis (ANOVA) and Tukey multiple range test ($P = 0.05$) and orthogonal contrasts with SAS statistical software (1999). In the case of the data in percentages, before being submitted to ANOVA and Tukey test under went an $\sqrt{0.5}$ angular transformation.

RESULTS AND DISCUSSION

The evaluation under field conditions considering two production cycles allowed a more accurately assessment of *Trichoderma* spp., biological effectiveness and control capacity on *F. oxysporum* and *F. subglutinans*, the causal agents of mango 'witches broom' disease.

Number of healthy and diseased inflorescences

del suelo (Westwood, 1982).

Severidad de la enfermedad. Se midió en base al número total de inflorescencias sanas y enfermas por el área de copa de cada árbol, se expresó en porcentaje.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de rangos múltiples de Tukey (P 0.05) y contrastes ortogonales, con el paquete estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al ANVA y prueba de Tukey, se les realizó la transformación angular de $\sqrt{0.5}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación bajo condiciones de campo considerando dos ciclos de producción permitió valorar con mayor precisión la efectividad biológica y la capacidad de control que tiene *Trichoderma* spp., sobre *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, agentes causales de la escoba de bruja del mango.

Número de inflorescencias sanas y enfermas por m² y totales. El ANVA detectó diferencias significativas para el número de inflorescencias sanas m² para el punto cardinal "Este" y total (Cuadro 2), donde los tratamientos biológicos: *T. lignorum*, Thzn-2, y Thzcf-12 con medias de 4.36, 4.19 y 3.46 respectivamente, obtuvieron la mayor cantidad, superando a los fungicidas químicos Benzotiazol + Mutilen bisticioanato, Benomilo y testigo con medias de 1.95, 1.77 y 1.55 inflorescencias sanas m². Comportamiento similar se observó en el total.

En relación al número de inflorescencia enfermas m², el ANVA no detectó diferencias significativas; sin embargo, se observó un comportamiento importante por punto cardinal ya que el número de inflorescencias enfermas está fuertemente influenciado por la dirección y velocidad del viento; según trabajos de Noriega-Cantú *et al.* (1999), la temperatura del aire y humedad relativa también son un factor importante; Mora *et al.* (2003), en un estudio realizado en el Valle de Apatzingán, Michoacán, indican que la mayor incidencia de la enfermedad está correlacionada

per m² and totals. ANOVA detected significant differences for the number of healthy inflorescences m² for the "East" cardinal point and total (Table 2), where the biological treatments: *T. lignorum*, Thzn-2 and Thzcf-12 with averages of 4.36, 4.19 and 3.46 respectively, showed the highest amounts, even higher than the Benzothiazole + Methylene bistiocyanate chemical fungicides, Benomyl and control with averages of 1.95, 1.77 and 1.55 healthy inflorescences m². Similar behavior was observed in the total.

In relation to the number of diseased inflorescences m², ANOVA did not detect significant differences; however, there was an important behavior by cardinal point as the number of diseased inflorescences was strongly influenced by the wind direction and speed; according to Noriega-Cantú *et al.* (1999) reports, the air temperature and relative humidity are also important factors; Mora *et al.* (2003), in a study carried out in Apatzingan Valley, Michoacan, reported that the highest incidence of the disease was correlated with inoculum density, temperature from 20 to 26.9 °C, relative humidity higher than 90 %, wind speed less than 10 km h⁻¹ towards north. In general, in this research, the highest number of diseased inflorescences was found towards North direction 2.74 m² and East 2.45 m², in contrast with the South which had an average of 2.36 m². Data from the National Center for Municipal Studies (1987) indicate that the wind direction in winter is from Southwest to Southeast which coincides with the flowering months (November to March) and with the presence of most inoculum reported for the north of Guerrero area (Mora *et al.*, 1998). The negative statistical significance can be explained in terms of the heterogeneity of the treatments; however, considering the numerical values where Thzn-2 was applied, the number of diseased inflorescences remained below the overall average and together with the other *Trichoderma* strains, a trend towards lower numerical values was observed.

Having the highest number of healthy inflorescences per total crown area involves preventative effect of the products used as the application started before flowering. In the two years average, ANOVA detected significant

Cuadro 2. Número de inflorescencias sanas y enfermas por m² del área de copa orientadas en cada punto cardinal (promedio de dos años).

Table 2. Number of healthy and diseased inflorescences per m² of the tree crown facing each cardinal point (average of two years).

Tratamiento	Norte		Sur		Este		Oeste		Total	
	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo
Thzn-2	4.02	2.03	3.93	1.75	4.19 a ^z	2.45	2.37	2.01	14.51 a ^z	8.24
Thzcf-12	2.52	2.31	1.83	2.76	3.46 a	2.50	2.74	2.00	10.55 a	9.57
MYCOBAC®	3.49	3.38	3.78	2.09	4.36 a	1.29	4.53	2.50	16.16 a	9.26
BENLATE®	2.79	2.21	1.27	2.01	1.77 b	2.48	2.59	2.59	8.42 b	9.29
BUSAN®	1.97	2.29	3.06	2.26	1.95 b	2.73	1.90	3.03	8.88 b	10.31
Testigo	2.72	4.23	2.19	3.27	1.56 b	3.23	3.36	2.37	9.83 b	13.10
Total	17.51	16.45	16.06	14.14	17.29	14.68	17.49	14.50	68.35	59.77
Promedio	2.92	2.74	2.68	2.36	2.88	2.45	2.92	2.42	11.39	9.97

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05)

con la densidad de inóculo, temperatura de 20 a 26.9 °C, humedad relativa mayor de 90 %, velocidad del viento menor a 10 km h⁻¹ y dirección norte. De manera general en esta investigación el mayor número de inflorescencias enfermas se encontraron en dirección del Norte 2.74 m⁻² y Este 2.45 m⁻², en contraste con el Sur en el que se presentó un promedio de 2.36 m⁻². Los datos del Centro Nacional de Estudios Municipales (1987) indican que la dirección del viento en invierno es de Suroeste al Sureste lo cual coincide con los meses de floración (Noviembre a Marzo) y presencia de mayor inóculo reportados para la zona Norte de Guerrero (Mora *et al.*, 1998). La no significancia estadística puede explicarse en función de la heterogeneidad de los tratamientos; sin embargo, considerando los valores numéricos donde se aplicó Thzn-2 el número de inflorescencias enfermas se mantuvo por debajo del promedio general y junto con las otras cepas de *Trichoderma* se observó una tendencia a presentar valores numéricos menores.

El tener mayor número de inflorescencias sanas por el área total de copa implica efecto preventivo de los productos utilizados dado que se comenzó la aplicación antes del inicio de floración. En el promedio de dos años, el ANVA detectó diferencias significativas para el contraste de los tratamientos biológicos a base de *Trichoderma* contra los tratamientos químicos (Cuadro 3); teniendo así que los mejores tratamientos fueron Thzn-2, Thzcf-12 y Mycobac®, con promedios de 473.99, 438.62 y 411.37 inflorescencias sanas por el área total de la copa, respectivamente; superó al testigo y a los químicos Benomilo y Benzotiazol + Metilene bistiocianato con medias de 367.34, 347.69 y 276.60, respectivamente. Estos datos son superiores a los obtenidos por Díaz-Balderas (2002), quien evaluó en condiciones de campo en Puente de Ixtla, Morelos, el benomilo para el control de la enfermedad y obtuvo 240 (44.1 %) inflorescencias sanas y 75 enfermas (24.1 %). Cabe mencionar que en el primer año de evaluación se obtuvo en promedio mayor número de inflorescencias sanas por área de copa (495.12) que en el segundo año, esto refleja la alternancia de la producción en

differences for the contrast of biological treatments based on *Trichoderma* against chemical treatments (Table 3); therefore, the best treatments were Thzn-2, Thzcf-12 and Mycobac®, with averages of 473.99, 438.62 and 411.37 of healthy inflorescences per total crown area, respectively; it also exceeded the control and the chemicals Benomyl and Benzothiazole + Metilene bis-thiocyanate with averages of 367.34, 347.69 and 276.60, respectively. These data are higher than those obtained by Díaz-Balderas (2002), who evaluated Benomyl under field conditions (Puente de Ixtla, Morelos) for control disease and they obtained 240 (44.1 %) healthy and 75 diseased inflorescences (24.1 %). It is important to mention that during the first year of evaluation, in average, it was obtained the highest number of healthy inflorescences per crown area (495.12) than in the second year, this reflects the alternation in production of this fruit.

In diseased inflorescences per total crown area, there were no statistically significant differences (Table 3); however, many treatments are reported with a control, Benomyl and Benzothiazole + Metilene bis-thiocyanate with averages of inflorescences of 373.50, 294.42 and 292.51, respectively; while the lowest amount obtained was with Thzn-2, Mycobac® and Thzcf-12, with inflorescences values of 198.78, 217.76 and 250.00, respectively; and observing that biological treatments reduced the number of diseased inflorescences.

In this sense, in order to prevent damage from diseases, including anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) and mildew (*Oidium mangiferae*), which are two of the major diseases together with witches broom, Vázquez-Valdivia (2009b) recommends three preventive applications, first with Captan W 50 % at a dose of 2 g L⁻¹ of water during flowering, and the second and third with Benomyl 50 % at a dose of 1 g L⁻¹.

Total number of fruits. All treatments were statistically equal during the first and second year; however, in the two years average, ANOVA detected significant differences, highlighting the native strain Thzn-2 with the highest number of fruits per tree (393.8), followed by *T. lignorum*, control and Thzcf-12 strain with averages of

Cuadro 3. Número de inflorescencias sanas y enfermas por área de copa promedio y por año.
Table 3. Number of healthy and diseased inflorescences per tree crown area per year.

Tratamiento	I fs1	I fs2	I fsX	I fe1	I fe2	I feX
Thzn-2	584.59	363.39	473.99 a ^z	226.38	171.17	198.78
Thzcf-12	639.58	237.66	438.62 ab	272.44	227.55	250.00
MYCOBAC®	382.51	440.23	411.37 ab	260.18	175.33	217.76
BENLATE®	499.61	195.77	347.69 ab	374.97	213.87	294.42
BUSAN®	354.38	198.82	276.60 b	308.99	276.02	292.51
Testigo	510.07	224.60	367.34 ab	472.54	274.45	373.50
Promedio	495.12	276.74	385.94	319.25	223.07	271.16

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey0.05)

I fs1 = Inflorescencias sanas año 1; I fs2 = Inflorescencias sanas año 2; I fsX = Inflorescencias sanas promedio

I fe1 = Inflorescencias enfermas año 1; I fe2 = Inflorescencias enfermas año 2; I feX = Inflorescencias enfermas promedio

este frutal.

En las inflorescencias enfermas por área total de copa, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 3); sin embargo, la mayor cantidad se reporta con los tratamientos Testigo, Benomilo y Benzotiazol + Metileno bisticianato con medias de 373.50, 294.42 y 292.51 inflorescencias, mientras que la menor cantidad con Thzn-2, Mycobac® y Thzcf-12, con valores de 198.78; 217.76 y 250.00 inflorescencias, respectivamente; observándose que los tratamientos biológicos han reducido la cantidad de inflorescencias enfermas.

En este sentido, para evitar daños por enfermedades, entre ellas antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y cenicilla (*Oidium mangiferae*), que son dos de las enfermedades de importancia y escoba de bruja, Vázquez-Valdivia (2009b) recomienda realizar tres aplicaciones preventivas, la primera con Captan W 50 % en dosis de 2 g L⁻¹ de agua durante la floración y la segunda y tercera con Benomil 50 % en dosis de 1 g L⁻¹.

Número total de frutos. Todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales en el primer y segundo año; sin embargo, en promedio de los dos años el ANVA detectó diferencias significativas, sobresaliendo la cepa nativa Thzn-2 con la mayor cantidad de frutos por árbol con un promedio de 393.8 frutos seguido *T. lignorum*, testigo y cepa Thzcf-12 con un promedio de 332.5, 324.7 y 311.8 frutos por árbol (Cuadro 4).

En el primer año de aplicación se obtuvo promedio general de 278.7 frutos, donde el testigo obtuvo el menor número (219.2) y la cepa Thzn-2 el mayor número con 386.6. En el segundo año el promedio fue mayor con 347.8 frutos, donde el testigo obtuvo el 430.1 y el fungicida Benzotiazol + Metileno bisticianato el menor número con 248.8 frutos; todo esto nos indica que la aplicación de *Trichoderma* podría favorecer las condiciones del suelo y logra mantener un equilibrio ya que a partir de la aplicación de *Trichoderma* se ha aumentado la cantidad de frutos por árbol. Aún cuando las aplicaciones fueron a la parte aérea (follaje y brotes), se bañó completamente cada árbol hasta que escurriera al suelo, por lo que indirectamente se aplicó también al suelo. A pesar de ello, la producción tiende a

332.5, 324.7 and 311.8 fruits per tree (Table 4).

In the first year of application an over all average of 278.7 fruits was obtained, where the control had the lowest number (219.2) and Thzn-2 strain had the highest number 386.6). During the second year, the average was higher with 347.8 fruits, where the control obtained the 430.1 and the fungicide Benzothiazole + Methylene bis-thiocyanate the lowest number of fruits (248.8); these results showed that *Trichoderma* application might favor soil conditions and help maintain an equilibrium, as its application increased the number of fruits per tree. Even when the applications were directly done to the aerial part (leaves and shoots), each tree was completely covered until it drained to the soil, thus indirectly it was also applied to the soil. Never the less, the production tends to increase in all treatments and the biological out number the chemical treatments, showing that a constant application restores the native and nonnative antagonists of the disease and there is a tendency to increase the production when biological antagonists are used.

In this regard, Vázquez-Valdivia *et al.* (2009a and b) reported that with a good management, by pruning and preventive applications of fungicides (tribasic copper sulfate, Captan and Benomyl), during flowering and fruit development, it helps to get good productions. In this work, the eight applications done were preventive because they started since the floral differentiation, fruit set and then fruit development, therefore, production increased from one year to another.

In general, in order to reduce 'witches broom' disease, INIFAP recommends to have a good orchard management, including irrigation, fertilization, weed control, pest and floral induction among others; as well as pruning and burning diseased branches and monthly application of fungicides (during seven months) such as Benomyl, wettable sulfur and tribasic copper sulfate after pruning (Munro-Olmos, 2008). In this study, more applications than recommended were done and in shorter intervals (every two weeks), protecting since the floral differentiation up to the fruit development, with satisfactory results as performance increased.

Productive Efficiency. There were no statistically

Cuadro 4. Número de frutos, eficiencia productiva y severidad de la enfermedad promedio y por año.

Table 4. Number of fruits, production efficiency, average disease severity and year.

Tratamiento	Fr1	Fr2	FrX	E P1	E P2	E PX	%S E1	%S E2	%S EX
Thzn-2	386.6	411.2	393.8 a ^z	70.6	135.0	102.8	33.4	26.6	30.0 b ^z
Thzcf-12	297.3	326.2	311.8 ab	30.9	89.3	60.1	38.1	47.5	42.8 ab
MYCOBAC®	291.5	373.6	332.5 ab	74.7	112.7	93.7	45.3	33.9	39.6 ab
BENLATE®	256.2	296.9	276.6 b	55.2	95.4	75.3	53.3	61.1	57.2 a
BUSAN®	221.4	248.8	235.1 b	48.6	117.7	83.2	47.2	48.7	48.0 ab
Testigo	219.2	430.1	324.7 ab	30.7	121.0	75.9	47.1	58.6	52.9 a
Promedio	278.7	347.8	312.4	51.80	111.9	81.8	44.1	46.1	45.1

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05)

Fr1 = Número de frutos año 1; Fr2 = Número de frutos año2; FrX = Número de frutos promedio

E P1= Eficiencia productiva año 1; E P2 = Eficiencia productiva año 2; E PX = Eficiencia productiva promedio

%S E1 = Porcentaje enfermedad año1; %S E2 = Porcentaje enfermedad año 2; %S EX = Porcentaje enfermedad promedio

aumentar en todos los tratamientos y los biológicos superan a los químicos, esto indica que una constante aplicación reestablece a los antagonistas nativos y no nativos de la enfermedad y se observa una tendencia a incrementar la producción cuando se protege con los biológicos antagonistas.

Al respecto, Vázquez-Valdivia *et al.* (2009a y b) indican que con un buen manejo, mediante podas y aplicaciones preventivas de fungicidas (sulfato tribásico de cobre, captan y benomilo), durante floración y desarrollo del fruto, se contribuye a obtener buena producción. Las ocho aplicaciones que realizamos fueron preventivas porque iniciaron desde la diferenciación floral, amarre y desarrollo de fruto, por lo que lograron incrementar la producción de un año al otro.

En general, el INIFAP recomienda para disminuir la presencia de escoba de bruja, hacer un buen manejo de la huerta, que incluya riegos, fertilización, control de malezas, plagas e inducción floral entre otros aspectos. Además de podar y quemar las ramas enfermas y la aplicación mensual por siete meses de fungicidas como el benomilo, azufre humectable y sulfato de cobre tribásico después de la poda (Munro-Olmos, 2008). En este sentido, nosotros realizamos más aplicaciones que las recomendadas, solo que en un intervalo más corto (cada quince días), protegiendo desde la diferenciación floral hasta el desarrollo del fruto, con resultados satisfactorios al incrementar rendimiento.

Eficiencia Productiva. No existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos; sin embargo, en el primer año los que mostraron una mayor eficiencia productiva fueron *T. lignorum* con 74.7 kg m² y Thzn-2 con 70.6 kg m² (Cuadro 4), en contraste con los tratamientos que mostraron menor eficiencia productiva que fue el testigo y la cepa Thzcf-12 con 30.9 y 30.7 kg m², respectivamente. En el segundo año, a pesar de que también no existieron diferencias estadísticas significativas, la eficiencia productiva mejoró con respecto al año anterior y los valores cambiaron, donde la cepa Thzn-2 obtuvo la mayor eficiencia productiva con 135 kg m² y la menor fue la cepa Thzcf-12 con 89.3 kg m².

En los dos años de evaluación no hubo diferencias estadísticas significativas, pero dos de los tratamientos biológicos superaron a los químicos y al testigo. Las medias de la eficiencia productiva promedio de los dos años muestran diferencias numéricas; los tratamientos que mostraron mayor aumento por unidad de área transversal del tronco fue *T. harzianum* cepa nativa Thzn-2 con 102.8 kg m² y *T. lignorum* con 93.7 kg m² mientras que los tratamientos que mostraron la menor eficiencia que fue *T. harzianum* cepa Thzcf-12 con 60.1 kg m² y Benomilo con 75.3 kg m² (Cuadro 4).

La cepa nativa Thzn-2 se restableció en su nicho según se incrementó su población, ya que para el primer año, *T. lignorum* tenía la mayor eficiencia productiva con 74.7 kg m² y para el promedio de dos años la cepa nativa Thzn-2 fue la que logró la mayor eficiencia productiva, esto se debe a que está mejor adaptada a las condiciones del ambiente de la huerta y se manifiesta en su efecto benéfico (Nelson, 1991; Arzate-Vega *et al.*, 2006).

significant differences between treatments; however, during the first year those that showed increased productive efficiency: were *T. lignorum* with 74.7 kg m² and Thzn-2 with 70.6 kg m² (Table 4), compared with the treatments that had the production efficiency: control and Thzcf-12 strain with 30.9 and 30.7 kg m², respectively. During the second year, although there were no statistically significant differences, productive efficiency improved from the previous year and values changed (Thzn-2 strain had the highest productive efficiency with 135 kg m² and the lowest was the Thzcf-12 strain with 89.3 kg m²).

In the two years of evaluation there were nonstatistically significant differences, but two of the biological treatments out performed chemicals and to the control. The mean average of production efficiency for the two years showed numerical differences; the treatments that showed higher increase per cross-sectional area unit of the trunk was *T. harzianum* native strain Thzn-2 with 102.8 kg m² and *T. lignorum* with 93.7 kg m², while the treatments that showed the lowest efficiency were *T. harzianum* Thzcf-12 strain with 60.1 kg m² and Benomyl with 75.3 kg m² (Table 4).

The Thzn-2 native strain was restored as its population increased, as during the first year, *T. lignorum* had the highest productive efficiency with 74.7 kg m² and for the two years average, Thzn-2 native strain was the one that achieved the highest efficiency, because it is better adapted to the environmental conditions of the orchard and it is manifested on its beneficial effect (Nelson, 1991; Arzate-Vega *et al.*, 2006).

Disease severity. ANOVA did not show significant differences; however, in the media test, the treatments based on *Trichoderma* showed reduced severity of the disease, ie with each *Trichoderma* application the severity was reduced. The Thzn-2 strain during the first and second year of evaluation had the lowest disease severity (33.4 % and 26.6 %, respectively); the average of the two years was 30.0 % (Table 4). In the same way, *T. lignorum*, that during the first and second year was 45.3 % and 33.9 %, in the two years average registered 39.7 %, in both strains the severity of the disease was reduced. However, the severity of the first year for Thcf-12 was 38.1 % and it increased in the second year to 47.5 %, with a 42.8 % two years average. These results might be due to the low strain adaptability to the orchard environment. In general, consecutive and constant biological product applications, allow this microorganism to adapt to the location and exert a natural biological control. In all trees the disease was manifested, ie there was a 100 % incidence and in general the orchard had high levels of severity, this can be due to several factors including: mango cv Haden, a susceptible genotype (Mora *et al.*, 2003) as well as to the age and poor agronomic management (Vázquez-Valdivia *et al.*, 2009a and b).

Díaz-Balderas (2002) reported 25.7 % severity when Benomyl was applied to cv Haden trees at Puente de Ixtla, Mor. A year later, Mora *et al.* (2003), found in Valle de Apatzingán municipalities some incidences that ranged between 15 and 87 %, with an average of 11 to 30 % severity. Mean while, Pérez-Barraza *et al.*, (2007) conducted a

Severidad de la enfermedad. El ANVA no detectó diferencias significativas; sin embargo, en la prueba de medias, los tratamientos a base de *Trichoderma* mostraron menor severidad de la enfermedad, esto es que a medida de que se aplica *Trichoderma* la severidad se reduce. La cepa Thzn-2 en el primer y segundo año de evaluación obtuvo la menor severidad de la enfermedad (33.4 % y 26.6 %, respectivamente); el promedio de dos años fue de 30.0 % (Cuadro 4). De la misma forma *T. lignorum* que en el primer y segundo año tuvo 45.3 % y 33.9 %, en el promedio de dos años registro 39.7 %, en ambas cepas la severidad de la enfermedad fue reduciéndose. Sin embargo, para Thcf-12 la severidad del primer año fue de 38.1 % e incrementó en el segundo año a 47.5 %, con un promedio de dos años 42.8 % esto puede deberse a la baja adaptabilidad de la cepa al ambiente de la huerta. En general, la aplicación consecutiva y constante de un producto biológico permite a este microorganismo adaptarse al lugar y ejercer un control biológico natural.

En todos los árboles se manifestó la enfermedad, es decir existió un 100 % de incidencia, en general la huerta presenta altos niveles de severidad, esto puede deberse a varios factores entre ellos: que se trata del cv Haden, un genotipo susceptible (Mora *et al.*, 2003) aunado a la edad y al escaso manejo agronómico (Vázquez-Valdivia *et al.*, 2009a y b).

Díaz-Balderas (2002) reportó 25.7 % de severidad cuando aplicó Benomilo en árboles de cv Haden en Puente de Ixtla, Mor. Un año después Mora *et al.* (2003), encontraron en los municipios del Valle de Apatzingán incidencias que fluctuaron entre los 15 y 87 %, con una severidad promedio de 11 al 30 %. Por su parte Perez-Barraza *et al.*, (2007) en un diagnóstico que realizaron del cultivo del mango en Nayarit reportan incidencias promedio de 34 %; sin embargo, en la zona centro tienen hasta 58 % por las condiciones climatológicas y huertas de 200 a 600 msnm; estos valores son inferiores a los presentados en la presente investigación, para el caso de los productos biológicos.

En este sentido, Noiaium y Soytong (2000) reportan a los productos biológicos formulados con *Trichoderma* (*T. harzianum* y *T. hamatum*) aplicados al mango en condiciones de campo resultaron más efectivos que los productos químicos para reducir el inoculo y la incidencia de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*. Además, la incidencia de ésta enfermedad en fruta fue similar entre los biofungicidas y los productos químicos, pero los tratamientos biológicos propiciaron mayor rendimiento que los tratamientos químicos.

Inclusive, Noiaium y Soytong (2000) indican que otro organismo que puede ejercer un control de la antracnosis en postcosecha es *Trichoderma harzianum*, habrá que realizar pruebas *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSIONES

Con los dos años de evaluación consecutivos se comprobó que *Trichoderma* spp., es un promisorio biocontrol para el control de los agentes causales de la "escoba de bruja" del mango. En particular, la aplicación de

mango diagnosis in Nayarit and reported incidences with 34 % average; however, in the central are they observed up to 58 % because of the climate and height orchards (200 to 600 masl); these values are lower than those presented in this work for the case of biological products.

In this regard, Noiaium and Soytong (2000) reported that biological products formulated with *Trichoderma* (*T. harzianum* and *T. hamatum*) applied to mango under field conditions were more efficient than chemicals to reduce the inoculum and the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnosis. Furthermore, the incidence of this disease in fruit was similar between biofungicides and chemicals, but biological treatments led to higher yield than chemical treatments.

Even Noiaium and Soytong (2000) reported that other organism that could exercise postharvest anthracnose control is *Trichoderma harzianum*, but *in vitro* and *in vivo* tests need to be done.

CONCLUSIONS

After two years of consecutive evaluation, it was found that *Trichoderma* spp. is a good biocontrol agent for mango "Witches' Broom" disease. In particular, the application of *Trichoderma harzianum* Thzn-2 native strains very effective; the first year it reduces the severity 13.7 %, the second year 32.0 % and on average 22.9 % compared with the control, surpassing the Benzothiazole + Metylene bis-thiocyanate and Benomyl chemical fungicides.

LITERATURA CITADA

- Arzate-Vega J, Michel-Aceves AC, Domínguez-Márquez VM y Santos-Eméstica OA. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigacota negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 24:98-104.
- Bhatnagar SS and Beniwal SPS. 1977. Involvement of *Fusarium oxysporum* in causation of mango malformation. Plant Disease Reporter 61:894-898.
- Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO and Wingfield MJ. 2002. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. Mycologia 94:722-730.
- Centro Nacional de Estudios Municipales. 1987. Iguala. Colección: Enciclopedia de los Municipios de México. Centro Nacional de Estudios Municipales, Secretaría de Gobernación. Pp. 203-208.
- Díaz-Balderas V. 2002. Bioensayos *in vitro*, forma de diseminación y control de la enfermedad "escoba de bruja" del mango causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. y *F. oxysporum* Schlecht. Folleto Técnico No. 19. INIFAP. Centro de Investigación Regional Centro. Campo Experimental "Zacatepec". Zacatepec, Morelos, México. 21p.
- Dennis C and Webster J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.

Trichoderma harzianum cepa nativa Thzn-2 es efectiva; el primer año redujo la severidad en 13.7 %, el segundo año 32.0 % y en promedio 22.9 % comparado con el testigo, superando a los fungicidas químicos Benzotiazol + Metilen bistiocianato y Benomilo, aunque las pruebas estadísticas no fueron significativas en todas las variables.

- Dennis C and Webster J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:41-48.
- De Waard MA, Georgopoulos SG, Hollomon DW, Ishii I, Leroux P, Ragsdale NN and Schwinn FJ. 1993. Chemical Control of plant disease: Problems and prospects. Annual Review of Phytopathology 31:403-421.
- FAO, 2012. Anuario de Producción. Producción Mundial de Mango. www.fao.org (consulta, junio 2012).
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. Phytopathology 89:456-461.
- Freeman S, Maimon M and Pinkas Y. 2000. Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. Acta Horticulture 509:731-758.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Cuarta edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D. F. 217p.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2005. Catálogo de Integración General de Localidades (CIGEL). II Censo de Población y Vivienda 2005. México, D.F. 100 p.
- Iqbal Z, Mehboob-ur-Rahman, Dasti AA, Saleem A, and Zafar Y. 2006. RAPD analysis of *Fusarium* isolates causing "Mango Malformation" disease in Pakistan. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1161-1167.
- Kumar J, Singh US and Beniwal SPS. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. Annual Review of Phytopathology 31:217-232.
- Michel-Aceves AC, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ochoa-Moreno ME, Mesina-Escamilla JC y Samuels G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 154-160.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sanchez MA, Rebolledo-Dominguez O, Lezama-Gutierrez R, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Revista Chapingo, Serie Horticultura 11:273-27.
- Michel-Aceves AC, Reyes-De La Cruz A, Otero-Sanchez MA, Rebolledo-Dominguez O y Lezama-Gutierrez R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* Pers.:Fr. spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e Invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 23:284-291.
- Michel-Aceves AC, Otero-Sanchez MA, Solano-Pascacio LY, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A, Rebolledo-Martínez 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.
- Mora AA, Vega PA, González RM y Javier MJ. 1998. Enfermedades del Mango. Pp. 18-44. In: Téliz-Ortíz D. (ed.). El mango y su manejo integrado en Michoacán. GIIM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México. 55p.
- Mora AA, Téliz OD, Mora AG, Sánchez GP y Javier MJ. 2003. Progreso temporal de "Escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:1-12.
- Munro-Olmos D. 2008. Guía para la prevención y control de plagas y enfermedades del cultivo del mango, en el estado de Colima. Comité Estatal de Sanidad Vegetal (Cesavecol), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) Campo Experimental Tecoman, Universidad de Colima (U de C), Consejo estatal del mango en Colima (Coemango) y Secretaria de Desarrollo Rural del Gobierno del Estado. 78p.
- Nelson EB. 1991. Handbook of Applied Mycology. pp-327-355. In: Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K. G., Knudsen, G. R. (Eds.) Current limits to biological control of fungal phytopathogens. Volume 1: Soil and Plants. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800p.
- Noiaium S and Soyong K. 2000. Integrated biological control of mango var. Choke Anan. Acta Horticulturae 509:769-778.
- Noriega-Cantú DH, Téliz-Ortíz D, Mora-Aguilera G, Rodríguez-Alcazar J, Zavaleta-Mejía E, Otero-Colinas G and Campbell CL. 1999. Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrate management. Plant Disease 83:223-228.
- Papavizas GC. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. Phytopathology 71:121-125.
- Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54.
- Pérez-Barraza MH, Vázquez-Valdivia V, Osuna-García JA, Ríos-Torres A y López-Arriaga G. 2007. Diagnostico del cultivo de mango en Nayarit. Folleto técnico no. 7. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Pacifico Centro. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Santiago Ixcuintla, Nayarit México. 43p.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028p.

Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. www.siap.sagarpa.gob.mx. Organismo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. (consulta, febrero 2012).

Vázquez-Valdivia V, Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA y Urías-López MA. 2009a. Intensidad de poda sobre el vigor, producción y peso del fruto, del mango "Ataulfo". Revista Chapingo Serie Horticultura 15:127-132.

Vázquez-Valdivia V, Pérez-Barraza MH, Osuna-García JA y Urías-López MA. 2009b. Manejo integral de huertos de mango "Ataulfo" con altas densidades de población. Revista Chapingo Serie Horticultura 15:155-160.

Westwood MN. 1982. Fruticultura de zonas templadas. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 461p.

Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate

Morphological and Molecular Identification of *Penicillium oxalicum* Causing Stem and Fruit Rot in Tomato

Raúl Allende Molar, Paola Alejandra Picos Muñoz, Isidro Márquez Zequera, José Armando Carrillo Fasio, Raymundo Saúl García Estrada y Josefina León Félix, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. km 5.5 Carretera a El Dorado, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México. Correspondencia: rallende@ciad.mx

(Recibido: Noviembre 21, 2012 Aceptado: Enero 14, 2013)

Allende Molar R, Picos Muñoz PA, Márquez Zequera I, Carrillo Fasio JA, García Estrada RS y León Félix J. 2013. Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología 30 : 13-19.

Resumen. Durante los ciclos hortícolas 2008, 2009 y 2010 se observó la presencia de una pudrición de tallos en plantas de tomate en áreas de cultivo en Culiacán, Sinaloa. En los tallos enfermos consistentemente se observó el crecimiento de un hongo de color gris-azul similar a *Penicillium* sp. Considerando que *Penicillium* no es un patógeno común en tomate, el objetivo fue determinar la especie de *Penicillium* que se encontraba infectando tallos y evaluar su potencial para producir pudrición en frutos en poscosecha. La patogenicidad de los aislamientos fue determinada mediante inoculaciones artificiales sobre tallos de plantas y en frutos sanos de tomate. La identificación morfológica del aislamiento fúngico incluyó la velocidad de crecimiento, la coloración de las colonias, los pigmentos producidos en los medios Agar Czapek Levadura y Agar Extracto de Malta y la forma y longitud de las esporas y el conidióforo. La identificación por técnicas moleculares se realizó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del ADNr, con los iniciadores ITS1/ITS4. *Penicillium oxalicum* Currie & Thom fue identificado como patógeno en plantas y en frutos de tomate en poscosecha en México.

Palabras clave adicionales: Tomate, pudrición del tallo, pudrición poscosecha.

El valle de Culiacán, en Sinaloa, es considerado una de las principales áreas productoras de tomate en México. En el ciclo agrícola 2010 se cultivaron 14,095 ha de tomate en Sinaloa (SIAP, 2012). En los ciclos agrícolas 2007-2008 y 2008-2009 se observó una pudrición en tallos de plantas de tomate establecidas bajo condiciones de malla sombra e invernadero. Los síntomas observados en plantas enfermas

Abstract. During the agricultural cycles 2008, 2009, 2010, a tomato stem rot has been observed in tomato growing areas in Culiacan, Sinaloa. A *Penicillium* sp. was consistently isolated from infected stem; Since *Penicillium* sp. is not a common pathogen on tomato, the objective was to identify the *Penicillium* sp. affecting tomato stems and to evaluate the potential of the fungus to cause postharvest rot in tomato fruits. Pathogenicity of the isolates was determined by artificial inoculations made in stems of healthy tomato plants. The morphological identification included the evaluation of colony growth rate and color, pigments of the colonies on Czapek Yeast Agar and Malt Extract Agar and the spore and conidiophore morphology. The identification by molecular techniques was performed by amplification and sequencing of a fragment of rDNA, with primers ITS1/ITS4. *Penicillium oxalicum* was identified as a pathogen on tomato plants and as a postharvest pathogen on tomato fruit.

Additional Keywords: *Penicillium oxalicum*, tomato, stem rot, postharvest rot.

The valley of Culiacan, Sinaloa state, is considered one of the major tomato producing areas in Mexico. During the 2010 agricultural cycle in Sinaloa, 14,095 ha of tomato were grown (SIAP, 2012). During the 2007-2008 and 2008-2009 agricultural cycles, rots in stems of tomato plants under net mesh or green house were observed. The symptoms observed in diseased plants are usually shown in the wounds that occur when the stems are subject to pruning. Wounds turn brown accompanied by a gray-blue fungus in a period of 24-48 h (Figure 1a). The top leaves of affected plants show an irregular growth and color turns yellow. In advanced stages of the disease, it can be seen that the main stem completely dries and kills the plant. Besides these symptoms, it has been observed in tomato plants, that when the fungus infects the fruit, they develop a brown coloration in the wound site and a bluish-gray fungus; lastly, a watery rot can be observed which grows forming a circle from the

se presentan en las heridas que ocurren cuando los tallos son sujetos a la poda de formación. Las heridas se tornan de color café acompañadas de un moho de color gris-azul en un periodo de 24-48 h (Figura 1a). Las hojas de la parte superior de las plantas afectadas muestran un crecimiento irregular y un color que se torna amarillo. En etapas avanzadas de la enfermedad se puede observar que el tallo principal se seca completamente, causando la muerte de la planta. Además de estos síntomas, en el tomate se ha observado que cuando el hongo infecta los frutos, éstos desarrollan una coloración café en el sitio de la lesión, además de un moho gris azulado; finalmente, se observa una pudrición acuosa, la cual avanza formando un círculo a partir del sitio de la infección inicial. Debido a que existen escasos antecedentes de esta enfermedad y se desconoce el potencial de pérdidas que ésta podría causar en la región, es necesario identificar al agente causal de la pudrición en tallos de tomate y adicionalmente evaluar su potencial patogénico en poscosecha en frutos de tomate.

La identificación tradicional de especies de hongos se basa principalmente en el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo y la posterior observación de las características morfológicas. Esta metodología es laboriosa y requiere de conocimiento amplio para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Actualmente, en la identificación de microorganismos se están utilizando técnicas moleculares en las que se extraen ácidos nucleicos y después se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas basan su utilidad al explotar secuencias polimórficas dentro de los espacios internos transcritos (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal o secuencias únicas en el ADN (Larena y Melgarejo, 2009).

Aunque ya hay un resumen previo publicado (Picos *et al.*, 2011), en este escrito se describen mayores detalles metodológicos, características de crecimiento en medios de cultivo del patógeno responsable de la pudrición de tallos en tomate, técnicas moleculares utilizadas para su identificación y evidencia de patogenicidad en frutos de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del microorganismo fitopatógeno.

Muestras de tallos de tomate híbrido imperial se colectaron de dos invernaderos del valle de Culiacán (Figura 1a). Pequeños trozos tomados del margen de las lesiones necróticas desarrolladas en los tallos, se sembraron en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se realizaron cultivos monospóricos en colonias desarrolladas en PDA y posteriormente, se tomaron discos de crecimiento activo del hongo y se preservaron en tubos con PDA inclinado con aceite mineral.

Pruebas de patogenicidad. La patogenicidad del aislamiento fúngico se determinó mediante inoculación de discos de crecimiento activo del hongo (5 mm diámetro) en tallos sanos de plantas de tomate de aproximadamente ocho semanas de edad en los que previamente se había realizado una herida (aproximadamente 5 mm diámetro) con un bisturí. El disco con crecimiento activo del hongo se sujetó

initial infection site. Because there is a limited track record of this disease and the potential losses that it might cause in the region are unknown, it is necessary to identify the causal agent of tomato stem rot and further evaluate its pathogenic potential in postharvest tomato fruits.

Traditional identification of fungus species is mainly based on the microorganism isolation in culture medium and the subsequent observation of their morphological characteristics. This methodology is laborious and requires extensive knowledge to distinguish between closely related species. Currently, in the microorganisms identification area, the molecular techniques in which nucleic acids are extracted and then amplified by chain reaction (PCR) are used. These techniques rely their effectiveness by exploiting polymorphic sequences within the internal transcribed spaces (ITS1 and ITS2) of ribosomal DNA or unique DNA sequences (Larena and Melgarejo, 2009).

Although there is a previous review already published (Picos *et al.*, 2011), in this paper, more methodological details, growth characteristics of the pathogen (responsible for the rot in tomato stems) in culture media, molecular techniques used for identification and evidence of pathogenicity in tomato fruits are described.

MATERIALS AND METHODS

Phytopathogenic microorganism isolation.

Imperial hybrid tomato stems samples were collected from two greenhouses in Culiacan Valley (Figure 1a). Small pieces taken from borders of the necrotic wounds of the stems were seeded in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. Monosporic cultures were done on colonies grown on PDA and then fungus active growth discs were sampled and preserved in slanted PDA tubes with mineral oil.

Pathogenicity tests. Pathogenicity of the fungal isolate was determined by inoculation of active growth discs of the fungus (5 mm diameter) in stems of healthy tomato plants of approximately eight weeks old on which a wound (approximately 5 mm diameter) with a scalpel was previously done. The fungus active growth disc was stuck to the wound with tape. In the control plants, the wound was done and a culture medium disc (5 mm diameter) was placed. The plants were kept in high humidity during 48 h then they were kept at room temperature in the laboratory. Pathogenicity in fruit included the growth of *Penicillium* sp. in PDA and once spores were produced, they were collected in sterile distilled water added with Tween 20 (0.1%) and the suspension was adjusted to 1×10^6 spores / mL. A 20 μ L aliquot of the spore suspension was added to a wound made with a sterile dissection needle. Inoculated fruits were kept in a storage chamber at 25 °C with 90 % relative humidity.

Morphological characterization. The isolation and identification of the *Penicillium* genus, was done using the methodology and keys proposed by Pitt (1979), which consist in growing the fungus in two specific culture media for genus: Czapek Yeast Agar (CYA) (3 g NaNO₃; 5 g yeast extract, 3 g sucrose, 1.3 g K₂HPO₄ · 3 H₂O; 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O; 0.5 g KCl; 0.01g FeSO₄ · 7H₂O; 0.005 g CuSO₄ · 5H₂O; 0.01 g ZnSO₄ · 7H₂O; 15 g agar; 1000 mL water; pH 6.3) and Malt Extract Agar (MEA) (30 g malt extract; 1 g

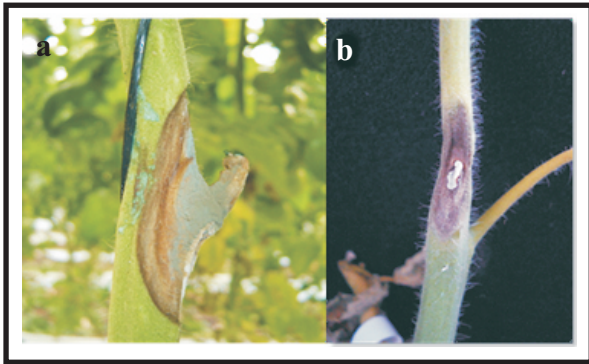


Figura 1. Síntomas de pudrición por *Penicillium* en tallos de tomate; a) Tallo infectado observado en invernadero; b) Tallo de planta de tomate con infección resultado de inoculación artificial.

Figure 1. *Penicillium* rot symptoms on tomato stems; a) Infected stem observed inside a greenhouse; b) Stem of tomato plant with infection, result of artificial inoculation.

a la herida mediante cinta. En las plantas testigo, se realizó la herida y se colocó un disco de medio de cultivo (5 mm diámetro). Las plantas se mantuvieron en alta humedad relativa durante 48 h y posteriormente fueron mantenidas a temperatura ambiente en el laboratorio. La patogenicidad en frutos incluyó el crecimiento de *Penicillium* sp. en PDA y una vez que produjo esporas, éstas se colectaron en agua destilada esterilizada adicionada con Tween 20 (0.1 %) y la suspensión se ajustó a 1×10^6 esporas/mL. Una alícuota de 20 μ L de esta suspensión de esporas se agregó en una herida causada por una aguja de disección estéril. Los frutos inoculados se mantuvieron en una cámara de almacenamiento a una temperatura de 25 °C con humedad relativa de 90 %.

Caracterización morfológica. El aislamiento e identificación del género *Penicillium*, se realizó mediante la metodología y claves propuestas por Pitt (1979), que consistió en sembrar el hongo en dos medios de cultivo específico para el género: Agar Czapek Levadura (CYA) (NaNO_3 3 g; extracto de levadura 5 g; sacarosa 3 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 1.3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; KCl 0.5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; agar 15 g; agua 1000 mL; pH 6.3) y Agar Extracto de Malta (MEA) (Extracto de malta 30 g; bactopectona 1 g; glucosa 20 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; agar 20 g; agua 1000 mL; pH 5.3). Posteriormente, en un periodo de siete días, se midieron las siguientes características macromorfológicas: el diámetro, coloración de la colonia y coloración al reverso de la colonia; y micromorfológicas como la presencia de conidios, filídes, ramificación, conidióforos, cleistotecios y esclerocios. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures) de la Real Academia de Ciencias y Artes de Los Países Bajos.

Extracción de ADN. Para la extracción del ADN, se utilizó el micelio de una colonia crecida durante tres días en medio MEA. El ADN se extrajo siguiendo la técnica de Ahrens y Seemuller (1992), la cual consiste en tomar

bactopectone; 20 g glucose; 0.005 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 20 g agar; 1000 mL water; pH 5.3). Subsequently, after seven days, the following macromorphological characteristics were measured: diameter, coloration of the colony and discoloration on the back of the colony; as for micromorphological characteristics: presence of conidia, phialides, branching, conidiospores, cleistothecia and sclerotia were measured. The results obtained were compared with the database of Fungal Biodiversity Centre (CBS Centraal bureau voor Schimmelcultures) of the Royal Academy of Sciences and Arts of the Netherlands.

DNA extraction. For DNA extraction, the mycelium of a colony grown during three days in MEA was used. DNA was extracted following the Ahrens and Seemuller (1992) technique which involves taking the growing mycelium in culture medium. Mycelia was placed in a mortar and homogenized with 1 mL of CTAB extraction buffer (1M Tris, pH = 8; NaCl 5M; EDTA 5M, pH 8; CTAB 2 %, PVP 1 %); then it was incubated at 65 °C during 30 min. The quantity and quality of extracted DNA was determined by measuring absorbance at 260 and 280 nm wavelength on an Eppendorf 6131 Bio Photometer; integrity was verified by electrophoresis in 1 % agarose gels stained with ethidium bromide. DNA samples were stored at -20 °C for later use.

Amplification of a fragment of the ITS 1 / ITS 2 regions. An internal fragment of the ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacer) regions was amplified between the ribosomal genes (rDNA) 18S - 5.8S and using the following primers: 5.8S - 28S ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). System used was Promega Go *Taq* Flexi DNA Polymerase and the reaction mixture was made of the following concentrations for each component: 1x Go *Taq* Flexi Buffer, 2 μ M MgCl_2 , 200 μ M dinucleotide triphosphate (dNTP's), 1 U Go *Taq* Polymerase, 0.2 μ M of each primer, 200 ng of *Penicillium* sp. DNA and sterile nanopure water to complete a total volume of 50 μ L. Amplifications were done with an initial cycle of 2 min to activate the enzyme; 35 cycles that included: denaturation at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min; and lastly, one final extension cycle at 72 °C for 10 min.

All Polymerase Chain Reactions (PCR) were carried out on a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, Mexico), amplifications were checked by gel electrophoresis on a 1 % agarose prepared with Tris-Acetate-EDTA 1x and run in the same buffer at 87 V cm^{-3} about 1 h. The gel was stained with 1 mL of ethidium bromide (10 mg mL^{-1}) and bands were visualized on a UV transilluminator.

Sequencing of the amplified fragment. The PCR product obtained with ITS 1/ITS 4 primers was verified by 1 % agarose gel electrophoresis, observing a band of 590 bp. Then, the amplified fragment was purified with the wizard SV Gel system and PCR Clean-Up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA). Sequencing was performed by capillary electrophoresis with an ABI PRISM 310 automated sequencer (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems) at the Molecular Biology Unit of the Institute of Cellular Physiology, UNAM. The nucleotide sequence

micelio en crecimiento en el medio de cultivo. El micelio se depositó en un mortero y se homogenizó con 1 mL de buffer de extracción CTAB (Tris 1 M, pH = 8; NaCl 5 M; EDTA 5 M, pH 8; CTAB 2 %, PVP 1 %); posteriormente, se incubó a 65 °C durante 30 min. La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un biofotómetro 6131 Eppendorf; la integridad, se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

Amplificación de un fragmento de las regiones ITS 1 / ITS 2. Se amplificó un fragmento de las regiones internas ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (ADNr) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S al utilizar los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Se utilizó el sistema Promega Go *Taq* Flexi DNA Polymerase y la mezcla de reacción se llevó a las siguientes concentraciones de cada uno de los componentes: 1 X de Go *Taq* Flexi Buffer, 2 µM de MgCl₂, 200 µM de dinucleótidos trifosforados (dNTP's), 1 U de Go *Taq* Polymerase, 0.2 µM de cada iniciador, 200 ng de ADN de *Penicillium* sp. y el resto de agua nanopura estéril, para un volumen total de 50 µL. La amplificación se realizó con un ciclo inicial de 2 min para la activación de la enzima; 35 ciclos que comprendieron: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 57 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 2 min; finalmente, un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Todas las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % preparado con amortiguador Tris - Acetato - EDTA 1X y corrido en el mismo amortiguador a 87 V cm⁻³ aproximadamente 1 h. El gel se tiñó con 1 µL de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

Secuenciación del fragmento amplificado. El producto de PCR obtenido con los iniciadores ITS 1/ITS 4 se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, observándose una banda de 590 pb. Posteriormente, el fragmento amplificado con los iniciadores se purificó con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA). La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con una búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS

Aislamiento del microorganismo fitopatógeno.

De las muestras de tallos de tomate con síntomas de pudrición, consistentemente se aisló un microorganismo de tipo fúngico. Las colonias del hongo en medio PDA

obtenida se comparó con una búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTS

Phytopathogenic microorganism isolation. From the samples with tomato stem rot symptoms, a microorganism of the fungal type was consistently isolated. Fungus colonies on PDA medium showed a bluish green color and a growth diameter of 40 mm after seven days. *Poxal220108* key was assigned to a representative fungal isolate as a reference for subsequent pathogenicity tests and morphological and molecular characterization.

Pathogenicity tests. The stems of tomato plants that were artificially inoculated with the fungus strain *poxal220108* and that were kept under high humidity conditions, showed rot symptoms similar to those observed in the field (Figure 1b). From the reisolates of the infected stems, colonies and fungal structures similar to the inoculated fungus (Figure 2a) were obtained, which confirmed pathogenicity of the inoculated fungal isolate. Reisolation of *Penicillium* sp. occurred only in plants with characteristic symptoms of this rot, inoculated plants with the disk medium remained healthy. Fruits inoculation showed that the fungus can potentially infect fruits in which a wound had occurred since in all inoculated fruits, after three days of inoculation, a rot was observed and then mycelium and sporulation of the fungus was observed. Fruits with sterile distilled water on the wounds, remained healthy.

Morphological identification. According to the database of the Fungal Biodiversity Center (CBS), the causal agent of stem rot and tomato plants death is the fungus *Penicillium oxalicum*. The growth characteristics of *P. oxalicum* in MEA medium are: colony diameter 30 mm with white coloring on the edges and bluish green towards the center (Figure 2b); in contrast, the growth in CYA medium, colony diameter was 40 mm with creamy white edges and pale brown towards the center. The observed branching pattern was biverticillate. The stipe showed 220 µm length x 5 µm wide, with two verticils. The phialides were ampulliform. Conidia measured 4.24 µm x 3.02 µm, ellipsoidal shape, smooth and in columns. *Poxal220108* isolate was deposited at the National Microbial and Cell Cultures Collection at CINVESTAV-IPN.

Molecular identification. The comparative analysis of the amplified DNA sequence was of 545 bp, it contained part of ITS1, the complete sequence of 5.8 s rRNA and part of ITS2 showed 99 % homology with various sequences of the ITS of several *Penicillium oxalicum* isolates (Gene Bank access no. AB378505, AB485602, DQ123663). The sequence of the amplified fragment was deposited at the NCBI database with access number HM452308.

DISCUSSION

Stem rot causes greenhouse tomato production losses that have not yet been quantified. *Penicillium*

mostraron un color verde azulado y un diámetro de crecimiento de 40 mm a los siete días. Se asignó la clave *poxal220108* a un aislamiento fúngico representativo como referencia para las posteriores pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica y molecular.

Pruebas de patogenicidad. Los tallos de plantas de tomate que se inocularon artificialmente con la cepa del hongo *poxal220108* y que se mantuvieron en condiciones de alta humedad relativa mostraron síntomas de pudrición similares a los observados en campo (Figura 1b). De los reaislamientos, de los tallos enfermos se obtuvieron colonias y estructuras fúngicas similares a las del hongo inoculado (Figura 2a), lo que confirmó la patogenicidad del aislamiento fúngico inoculado. El reaislamiento de *Penicillium* sp. ocurrió sólo en plantas en las que se observaron los síntomas característicos de esta pudrición, las plantas inoculadas con el disco de medio de cultivo permanecieron sanas. La inoculación en frutos mostró que el hongo potencialmente puede infectar a frutos en los que haya ocurrido una herida ya que en todos los frutos inoculados, a los tres días después de la inoculación, se observó una pudrición y posteriormente se observó el micelio y esporulación del hongo. Los frutos en los que se depositó en la herida agua destilada esterilizada permanecieron sanos.

Identificación morfológica. De acuerdo con la base de datos del centro de biodiversidad de hongos (CBS), el agente causal de la pudrición de tallos y muerte de plantas de tomate es el hongo *Penicillium oxalicum*. Las características de crecimiento de *P. oxalicum* en medio MEA son: diámetro de la colonia de 30 mm con coloración blanco en las orillas y verde azulado hacia el centro (Figura 2b); en contraste, el crecimiento en medio CYA el diámetro de la colonia fue de 40 mm con una coloración blanco cremoso en las orillas y café pálido hacia el centro. El patrón de ramificación observado fue biverticilado. La estipe mostró una longitud de 220 μm x 5 μm de ancho, con 2 verticilios. Las fíalides fueron ampuliformes. Los conidios midieron 4.24 μm x 3.02 μm , de forma elipsoidal, lisos y en columnas. El aislamiento *poxal220108* fue depositado en la Colección Nacional Microbiana y de Cultivos Celulares del CINVESTAV-IPN.

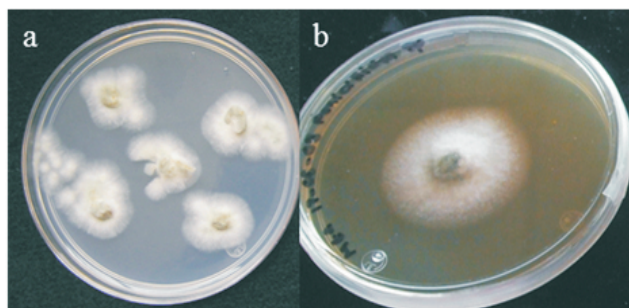


Figura 2. Colonias de *Penicillium*. a) Desarrolladas en PDA a partir de tejidos infectados resultantes de inoculación artificial y b) en medio de cultivo MEA.
Figure 2. *Penicillium* colonies. a) Developed in PDA from infected tissues resulting from artificial inoculation and b) in MEA culture medium.

oxalicum species had not been reported as a pathogen of tomato fruits in Mexico, although there is a report of rot caused by this species in tomato stems in Japan (Umemoto *et al.*, 2009) and in tomato fruits in Korea (Kwon *et al.*, 2008). *Penicillium oxalicum* Currie & Thom also has been associated with stem rot on greenhouse cucumber in Canada (Jarvis *et al.*, 1990) and in England, Holland, Denmark, Sweden and Norway (O'Neill *et al.*, 1991). The resulting symptoms include brown lesions in the basal part of the plant with a fungus sporulation in blue-green color and then the death of the plant (Jarvis and Ferguson, 1992).

In the characterization by molecular techniques, the PCR-amplified fragment with ITS1/ITS4 primers was of 545 bp, which coincides with that reported by Chen *et al.*, (2001) who used the ITS of these rDNA regions to identify medically important yeast and Umemoto *et al.* (2009), who obtained a 100 % homology in the identification of *Penicillium* species, using sequencing of intergenic regions. Regarding the comparative analysis of the sequences with the NCBI database, the limitation of analyzing nucleotide sequences obtained from rDNA, including *Penicillium* spp. is the presence of polymorphisms. For example, Dupont *et al.* (2006) were able to only identified 35 isolates from a group of group 60 when they used for PCR amplification of the ITS region and a group of restriction enzymes. This suggests that molecular biology studies are helping to understand the phylogeny of the genus *Penicillium*, but reach a monophyletic classification of the mitosporic fungi would be complicated because it would not often correspond



Figura 3. Síntomas de pudrición por *Penicillium* en frutos de tomate a los cinco días después de la inoculación artificial. Los frutos fueron heridos con una aguja de disección estéril y posteriormente una alícuota de 20 μL a una concentración de 1×10^6 esporas/mL de *Penicillium* sp. fue depositada en la herida.

Figure 3. *Penicillium* rot symptoms in tomato fruits after five days of artificial inoculation. Fruits were wounded with a sterile dissection needle and then a 20 μL aliquot at a concentration of 1×10^6 spores / mL of *Penicillium* sp. was deposited in the wound.

Cuadro 1. Comparación de resultados obtenidos a partir de muestras aisladas con *Penicillium oxalicum* (Samsom *et al.* 2004).

Table 1. Comparison of results obtained from samples isolated with *Penicillium oxalicum* (Samsom *et al.* 2004).

Caracteres	<i>Penicillium</i> sp. <i>Poxal220108</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>
<i>Medio YA*25 °C</i>		
Diámetro colonia	37 mm	35-60
Coloración de colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
Coloración al reverso de la colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
<i>Medio MEA** 25 °C</i>		
Diámetro de la colonia	29 mm	20-50
Coloración de la colonia	Blanco-crema	Blanco-crema
Coloración al reverso de la colonia	Blanco-crema	Amarillo
<i>Conidios</i>		
Longitud	4.24 µm	5-7 µm
Ancho	3.02 µm	2.5-4µm
Forma	Elipsoidal	Elipsoidal
Ornamentos	Liso	Liso
<i>Fiálides</i>		
Forma	Ampuliforme	Ampuliforme
<i>Vesícula apical</i>	Ausente	Ausente
<i>Estipe</i>		
Longitud	220 µm	200-400 µm
Ancho	5 µm	3.5-5 µm
Ornamentos	Liso	Liso
Ramificación	Biverticilada	Monoverticilada, Biverticilada
<i>Cleistotecios</i>	Ausente	Ausente

*Agar Czapek Levadura

**Agar Extracto de Malta

Identificación molecular. El análisis comparativo de la secuencia de ADN amplificado fue de 545 pb, contuvo parte del ITS1, la secuencia completa del 5.8 s ARNr y parte del ITS2 y mostró máxima identidad con secuencias del ITS de varios aislamientos de *Penicillium oxalicum* (Gen Bank no. acceso AB378505, AB485602, DQ123663). La secuencia del fragmento amplificado se depositó en la base de datos del NCBI con el número de acceso HM 452308.

DISCUSIÓN

La pudrición de tallos de tomate de invernadero ocasiona pérdidas en la producción que aun no han sido cuantificadas. La especie *Penicillium oxalicum* no se había reportado como patógeno de frutos de tomate en México, aunque existe un reporte de pudrición causada por esta especie en tallos de tomate en Japón (Umamoto *et al.*, 2009) y en frutos de tomate en Korea (Kwon *et al.*, 2008). *Penicillium oxalicum* Currie & Thom también se ha asociado con pudriciones de tallos en pepino de invernadero en Canadá (Jarvis *et al.*, 1990) y en Inglaterra, Holanda,

with existing morphological classification (Peterson, 2000). In the present study, the use of morphological and molecular characteristics complement each other and confirm the identification of the *Penicillium* species involved in the stems disease and tomato fruits.

CONCLUSIONS

The morphological identification and by molecular techniques coincided in assign *Penicillium oxalicum* as the causal agent of stem rot and death of tomato plants. This is the first report in Mexico that demonstrates the potential of *Penicillium oxalicum* to cause infections in postharvest tomato fruits.

LITERATURACITADA

- Ahrens U and Seemuller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rDNA gene. *Phytopathology* 82:828- 832.
- Altschul S, Gish W, Miller, W, Meyer E and Lipman D.

Dinamarca, Suecia y Noruega (O'Neill *et al.*, 1991). Los síntomas ocasionados incluyen lesiones color café en la parte basal de la planta con una esporulación del hongo en color azul-verdoso y posteriormente la muerte de la planta (Jarvis y Ferguson, 1992).

En la caracterización mediante técnicas moleculares, el fragmento amplificado por PCR con los iniciadores ITS1/ITS4 resultó de 545 pb, lo cual coincide con lo reportado por Chen *et al.* (2001) quienes utilizaron los ITS de estas regiones del ADNr para identificar levaduras de importancia médica y Umemoto *et al.* (2009), quienes obtuvieron una homología del 100 % en la identificación de especies de *Penicillium*, al utilizar la secuenciación de regiones intergénicas. En cuanto al análisis comparativo de las secuencias con la base de datos del NCBI, la limitante de analizar las secuencias de nucleótidos obtenidas del ADNr, en particular de *Penicillium* spp. es la presencia de polimorfismos. Por ejemplo, Dupont *et al.* (2006) solamente identificaron la especie en 35 aislamientos, de un grupo de 60, cuando utilizaron la amplificación por PCR de la región del ITS y la utilización de un grupo de enzimas de restricción. Esto sugiere que los estudios de biología molecular están ayudando a comprender la filogenia de las especies del género *Penicillium*, pero llegar a establecer una clasificación monofilética de los hongos mitospóricos, sería complicado ya que ésta no correspondería en muchas ocasiones, con la clasificación morfológica existente (Peterson, 2000). En nuestro estudio la utilización de características morfológicas y moleculares se complementan y confirman la identificación de la especie de *Penicillium* involucrada en la enfermedad en tallos y frutos de tomate.

CONCLUSIONES

La identificación morfológica y por técnicas moleculares coincidieron en asignar a *Penicillium oxalicum* como el agente causal de la pudrición de tallos y muerte de plantas de tomate. Este es el primer reporte en México que demuestra el potencial de *Penicillium oxalicum* para causar infecciones en frutos de tomate en poscosecha.

1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Chen Y, Eisner J, Kattar M, Rassoulia K, Uyen B and Limaye A. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4042-4051.

Dupont J, Dennetière B, Jacquet C and Roquebert M. 2006. PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana de Micología* 23: 145-150.

Jarvis W, Barrie SD, Traquair JA and Stoessl A. 1990. Morphological and chemical studies of *Penicillium oxalicum*, newly identified as a pathogen on greenhouse cucumbers. *Canadian Journal of Botany* 68:21-25.

Jarvis W and Ferguson M. 1992. A survey of *Penicillium* stem rot on greenhouse cucumbers in southwestern Ontario. *Canadian Plant Disease* 72:103-106.

Kwon JH, Shen SS and Jee, HJ. 2008. Occurrence of blue mold on tomato caused by *Penicillium oxalicum* in Korea. *Plant Pathology Journal* 24:87-89.

Larena I and Melgarejo P. 2009. Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* strain 212 by combining PCR and a selective medium. *Plant Disease* 93:919-928.

O'Neill TM, Bagabe M and Ann DM. 1991. Aspects of biology and control of a stem rot of cucumber caused by *Penicillium oxalicum*. *Plant Pathology* 40:78-84.

Peterson S. 2000. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. Pp: 163-178. *In: Samsom R and Pitt J (eds.)*. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Publisher, Amsterdam. 510 p.

Picos-Munoz PA, Garcia-Estrada RS, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J and Allende-Molar R. 2011. First report of *Penicillium oxalicum* in tomato (*Solanum lycopersicum*) in Mexico. *Plant Disease* 95:1195.

Pitt JI. 1979. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK. 634 p.

Samson RA, Hoekstra ES and Frisvad JC. 2004. Introduction to Food-and Airborne Fungi. Ed. 7 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda. 389 p.

SIAP. 2012. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (consulta, octubre 2012).

Umemoto S, Odake Y, Takeuchi T, Yoshida S, Tsushima S and Koitabashi M. 2009. Blue mold of tomato caused by *Penicillium oxalicum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 399-400.

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. *In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White T (eds.)*. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press Inc. 482 p.

DetECCIÓN POR RT-PCR PUNTO FINAL Y TIEMPO REAL DE TRES ESPECIES DE VIROIDES EN CÍTRICOS DE NUEVO LEÓN Y TAMAULIPAS, MÉXICO

DETECTION OF THREE CITRUS VIROIDES SPECIES FROM NUEVO LEON AND TAMAULIPAS, MEXICO BY CONVENTIONAL AND REAL TIME RT-PCR

César Enrique Guerrero Gámez, Omar Guadalupe Alvarado Gómez*, Hazael Gutiérrez Mauleón, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. CP 66451, México; Ramiro González Garza, Biociencia S.A. Agustín Melgar 2317 norte Col. Reforma, Monterrey, N.L., CP 64550, México; María Genoveva Álvarez Ojeda, INIFAP, Campo Experimental Río Bravo, Tamaulipas. Mauricio Luna Rodríguez. Dirección General de Investigaciones, Universidad Veracruzana. *Correspondencia: omar-alvarado@prodigy.net.mx.

(Recibido: Enero 24, 2013 Aceptado: Marzo 13, 2013)

Guerrero Gámez CE, Alvarado Gómez OG, Gutiérrez Mauleón H, Gozález Garza R, Álvarez Ojeda MG y Luna Rodríguez M. 2013. Detección por RT-PCR punto final y tiempo real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:20-28.

Resumen. Se desarrollaron tres protocolos de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green y se compararon con el método convencional RT-PCR punto final para la detección del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) y el viroide del enanismo de los cítricos (CDVd) tras evaluar distintas combinaciones de iniciadores específicos; adicionalmente se realizó el análisis para los tres viroides referidos en 90 muestras de cítricos colectadas en huertas del noreste de México. Las muestras evaluadas comprendieron diferentes especies colectadas en los municipios de General Terán, Montemorelos y Marín, en Nuevo León, además de Río Bravo, Cd. Victoria e Hidalgo, en Tamaulipas. Se extrajo el ARN total de las muestras, y fueron analizadas mediante las técnicas de RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. Se detectó la presencia individual y conjunta de los viroides CEVd, HSVd y CDVd en las muestras analizadas. Usando la técnica de RT-PCR tiempo real con SYBR Green, se obtuvo un 41 % de muestras positivas a CEVd, 42 % a HSVd y 49 % al CDVd. Al comparar las técnicas de RT-PCR punto final y tiempo real, se obtuvieron resultados similares.

Palabras clave adicionales: RT-PCR, RT-PCR tiempo real, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

Abstract. Three protocols were developed based on real-time RT-PCR with SYBR Green system and were compared with conventional RT-PCR for detection of the Citrus exocortis viroid (CEVd), Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus dwarf viroid (CDVd) using specific primers combinations; additionally, we conducted the analysis of citrus viroids from 90 citrus threes samples collected in orchards in the northeast of Mexico. Evaluated citrus samples comprised different species from the municipalities of General Teran, Montemorelos and Marín, Nuevo Leon, besides Río Bravo, Victoria city and Hidalgo, Tamaulipas. Total RNA was extracted from the samples and analyzed by the techniques of multiple RT-PCR and real time RT-PCR with the SYBR Green system. We detected CEVd, HSVd and CDVd viroids individually and jointly in the samples. Using real-time RT-PCR with SYBR Green, we found a 41 % of CEVd positive samples, 42 % for HSVd and 49 % to CDVd. Comparing endpoint multiplex RT-PCR with real-time RT-PCR techniques, minimal differences were obtained in the results.

Additional keywords: RT-PCR, real-time RT-PCR, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

Mexico is one of the major producers of Persian lime, Mexican lime, sweet orange, grape fruit, tangerine and other citrus species, and it is one of the main exporting countries world wide (USDA, 2012).

During 1972 and 1977, the causal agents of the diseases exocortis (CEVd) and citrus cachexia (HSVd) were identified (Diener, 1979). Later on, in 1988 the Citrus Dwarfing Viroid (CDVd) was identified (Duran-Vila *et al.*,

México se ha distinguido por su producción de limón persa, limón mexicano, naranja dulce, toronja, mandarina y otras especies de cítricos, y es de los principales países exportadores a nivel mundial (USDA, 2012).

En los años 1972 y 1977 se identificaron los agentes causales de las enfermedades exocortis (CEVd) y cachexia de los cítricos (HSVd), respectivamente (Diener, 1979). Posteriormente, en 1988 se identificó el viroide del enanismo de los cítricos, CDVd (Duran-Vila *et al.*, 1988). Los viroides de cítricos se encuentran distribuidos en distintas partes del mundo, tales como: la región del Mediterráneo, Australia, Norte y Sur de África, Europa, Asia, además del Norte, Centro y Sur del Continente Americano (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.*, 2003; Önelge, 2010).

Los viroides de los cítricos pertenecen a la familia *Pospiviroidae*. Están constituidos por moléculas de ARN monocatenario cerradas covalentemente sin capacidad codificante, y capaces de replicarse de forma autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células que parasitan. El tamaño de su genoma es de alrededor de 246-402 nt; presentan forma de varilla o ramificada y ocasionan diferentes síntomas de acuerdo con las combinaciones entre especies de viroides y hospederos, pudiendo existir incluso sinergismo entre viroides, cuando ocurren de manera simultánea en más de una especie. Pueden provocar agrietamientos y escamas en la corteza, enanismo, epinastia, entre otros daños, en especies susceptibles (Flores, 2001; Vidalakis *et al.*, 2004; Bernard y Duran-Vila, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Bagherian y Izadpanah, 2010).

Habitualmente los viroides de los cítricos se diagnostican mediante bioensayos en la planta indicadora cidra Etrog Arizona 861-S1 (*Citrus medica* L.) injertada sobre limón rugoso (*C. jambhiri* Lush) y Volkameriano (*C. Volkamer* Ten y Pasq.) pudiendo observarse la expresión de los síntomas de 3 a 6 meses después de su inoculación (Palacio *et al.*, 1999). Sin embargo, estos síntomas no permiten identificar la especie del viroide. El análisis de ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares constituyen una alternativa a los bioensayos para la detección e identificación de las especies de los viroides de los cítricos (Malfitano *et al.*, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2009). Algunos trabajos han demostrado el potencial de la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (RT-PCR) para la detección individual de viroides, y la RT-PCR múltiple para la detección simultánea de varios viroides (Ito *et al.*, 2002; Bernard y Duran-Vila, 2005; Wang *et al.*, 2009). En México hay pocos trabajos sobre la detección de viroides de cítricos por RT-PCR (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002 y 2005). En años recientes se han puesto a punto técnicas de detección de patógenos y moléculas más sensibles y rápidas, como la RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green y sondas TaqMan, la cual intercala una molécula fluorescente en la doble cadena de ADN produciendo una señal que revela, con la ventaja de la amplificación exponencial en cada ciclo térmico. Gracias a su potencial la RT-PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección del viroide del tubérculo fusiforme de la papa,

1988). Citrus viroids are distributed in different parts of the world such as the Mediterranean region, Australia, North and South Africa, Europe, Asia, and North, Central and South Americas (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.* 2003; Önelge, 2010).

Citrus viroids belong to the *Pospiviroidae* family. They consist of single-stranded RNA molecules covalently linked without coding capacity and that are able to replicate autonomously using the transcriptional machinery of the cells they parasitize. Their genome size is about 246-402 nt; they are rod-shaped or branched and can cause various symptoms depending on the combinations between viroid and host species, even synergism among viroids can exist when they occur simultaneously in more than one species. They can cause cracking and flaking of the bark, stunting, epinasty, among other damages in susceptible species (Flores, 2001; Vidalakis *et al.*, 2004, Bernard and Duran-Vila, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Bagherian and Izadpanah 2010).

Usually citrus viroids are diagnosed using bioassays in the indicator plant Arizona 861-S1 Etrog citron (*Citrus medica* L.) grafted on rough lemon (*C. jambhiri* Lush) and Volkamerian (*C. Volkamer* Ten and Pasq.) observing the symptoms expression 3-6 months after inoculation (Palace *et al.*, 1999). However, these symptoms do not allow to identify the viroid species. Nucleic acid analysis using molecular techniques provide an alternative to bioassays for detection and identification of citrus viroids species (Malfitano *et al.*, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2009). Some studies have shown the potential of the reverse transcription followed by conventional polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect individual viroids, and multiple RT-PCR for simultaneous detection of several viroids (Ito *et al.*, 2002, Bernard and Duran-Vila, 2005, Wang *et al.*, 2009). In Mexico there are few studies on the detection of citrus viroids by RT-PCR (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002 and 2005). In recent years, techniques for pathogen detection and faster and more sensitive molecules have been tuned, such as real time RT-PCR using SYBR Green system and TaqMan probes, which they insert a fluorescent molecule in the double-stranded DNA chain producing a signal that reveals the advantage of the exponential amplification on each heat cycle. Due to real time RT-PCR potential, it has been used to detect the potato spindle tuber viroid, as well as citrus viroids such as CEVd, HSVd and CDVd (Tessitori *et al.*, 2005; Rizza *et al.* 2009).

Because of the problems that viroids cause in citrus, in addition to the scarce information of their incidence in Mexico, studies on citrus plantations in the northeastern region are necessary in order to have a more accurate perception of the current phytosanitary situation. Therefore, the aim of this work was to implement the real time RT-PCR method with SYBR Green system and compare it with the endpoint RT-PCR method to determine the incidence of three citrus viroids in commercial plantations of the Nuevo Leon and Tamaulipas states, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Real-time RT-PCR standardization. Real-time

además de viroides de cítricos como el CEVd, HSVd y CDVd (Tessitori *et al.*, 2005; Rizza *et al.*, 2009).

Debido a los problemas que causan los viroides en los cítricos, además de la escasa información que existe sobre su incidencia en México, es necesario realizar estudios en plantaciones cítricas en la región noreste para tener una percepción más precisa de la situación fitosanitaria actual. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue implementar el método de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green y compararlo con el método de RT-PCR punto final al determinar la incidencia de tres viroides de los cítricos en plantaciones comerciales de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estandarización de RT-PCR tiempo real. Se estandarizó la técnica de RT-PCR tiempo real en un solo paso con el sistema iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR Green® (Bio-Rad), utilizando controles positivos de ARN total conteniendo a los viroides CEVd, HSVd y CDVd; los cuales fueron proporcionados por la empresa Biociencia S.A. Como controles negativos se utilizó ARN de plantas libres de viroides. Se evaluaron varias combinaciones de iniciadores específicos a cada uno de los viroides anteriores (Cuadro 1). Para cada uno de los ensayos se utilizó un

RT-PCR technique was standardized in one step with the iScript™ One-Step RT-PCR system with SYBR Green® (Bio-Rad), using total RNA positive controls containing CEVd, HSVd and CDVd viroids, which were provided by Biociencia SA Company. RNA viroid-free plants were used as negative controls. Various combinations of specific primers were evaluated on each of the previous viroids (Table 1). For each assay a thermal program according to manufacturer's specifications was used and the annealing temperature for CEVd was 56 °C and 58 °C for HSVd and CDVd. Furthermore, in order to make sure that primers did not form dimers, an 80 cycle's dissociation curve at 55-95 °C for 1 min was integrated on each assay with 0.5 °C increments per cycle.

Analysis of field samples. A lot of 90 collected samples was processed in eight commercial citrus orchards located in the municipalities of General Teran (Las Anacuas and Jorge Martinez), Montemorelos (Hacienda "El Mexiquito") and Marin (Experimental Field of the Agronomy Faculty, UANL), Nuevo Leon state; furthermore, some samples were obtained from INIFAP Experimental field and from "Real de Catorce" commercial orchard located in the municipalities of Rio Bravo and Ciudad Victoria, respectively; also from the orchards "El Desengaño" and "Puente Azul" (Hidalgo, Tamaulipas).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green para tres viroides de cítricos.

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR with SYBR Green system for three citrus viroids.

Tratamiento	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
1	CEVd-5 CEVd-F	acgagctctctgtttctcccgtg ggaaacctggaggaagtgcg	165	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Palacio <i>et al.</i> (1999)
2	CEVd-F CEVd-b	ggaaacctggaggaagtgcg tgtttctccgctggagcg	83	Palacio <i>et al.</i> (1999) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
3	CEVd-7 CEVd-b	ccggcgagggtgaaagccc tgtttctccgctggagcg	169	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
4	CEVd-5 CEVd-7	acgagctctctgtttctcccgtg ccggcgagggtgaaagccc	86	Sieburth <i>et al.</i> (2002)
5	HSVd-b CVdII-H1	gtctcactcgaagaccag cgccccgggcaactcttctcagaatcc	138	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Palacio <i>et al.</i> (1999)
6	CCaVd-der CVdII-H1	cgccggcagaggtcagatag cgccccgggcaactcttctcagaatcc	202	Levy y Hadidi (1993) Palacio <i>et al.</i> (1999)
7	HSVd-b CV2-AP (+)	gtctcactcgaagaccag ggcaactcttctcagaatccagc	131	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Ito <i>et al.</i> (2002)
8	CCaVd-der CV2-AP (+)	cgccggcagaggtcagatag ggcaactcttctcagaatccagc	195	Levy y Hadidi (1993) Ito <i>et al.</i> (2002)
9	CVdIII-C CVdIII-F	ttcgtcgcagacgacaggta gtctccgctagtcggaaagactccg	85	Palacio <i>et al.</i> (1999) Sieburth <i>et al.</i> (2002)
10	CVdIII-F CVdIII-R	gtctccgctagtcggaaagactccg cgtcaccacttagctgctctcg	269	Sieburth <i>et al.</i> (2002)

programa térmico de acuerdo con las especificaciones del fabricante cambiando solamente la temperatura de anillamiento siendo de 56 °C para CEVd, y 58 °C para HSVd y CDVd. Además para comprobar que los iniciadores no formaran dímeros, a cada ensayo fue integrada una curva de disociación de 80 ciclos a una temperatura de 55-95 °C durante 1 min. con incrementos de 0.5 °C por cada ciclo.

Análisis de muestras de campo. Se procesaron 90 muestras colectadas en ocho huertas comerciales de cítricos, ubicadas en los municipios de Gral. Terán (Las Anacuas y Jorge Martínez), Montemorelos (Hacienda “El Mexiquito”) y Marín (Campo Experimental de la Facultad Agronomía de la UANL) del estado de Nuevo León; además se obtuvieron muestras del Campo Experimental del INIFAP y del huerto comercial “Real de Catorce” ubicados en los municipios de Río Bravo y Cd. Victoria, respectivamente; y de los predios “El Desengaño” y “Puente Azul”, en Hidalgo, Tamaulipas. Las especies de cítricos muestreadas fueron: naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), toronja (*C. paradisi* M.), limón (*C. limon* L.) y mandarina (*C. reticulata* B.). Se colectaron de manera aleatoria ramas y hojas de árboles adultos. Se realizó una extracción del ácido ribonucleico total (ARN) de las muestras mediante el método comercial Trizol[®] (Molecular Research Center), y se analizaron las muestras por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real en un solo paso. Los iniciadores utilizados en las reacciones de RT-PCR punto final se describen en el Cuadro 2.

Las reacciones de RT-PCR múltiple punto final fueron llevadas a cabo en un volumen 25 µL de acuerdo con Wang *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Se utilizó el kit Super Script One step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum[®] (Invitrogen). En las mezclas de reacción se incorporaron los iniciadores a una concentración de 0.2 µM para CDVd, 0.5 µM para CEVd y 0.1 µM para HSVd (Cuadro 2). El protocolo consistió en mezclar 12.5 µL de amortiguador 2X, 6.75 µL de una mezcla de 6 iniciadores, 0.5 µL de enzima RT-*Taq* y de 150 a 200 ng de ARN (2 µL). Se completó el volumen total con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros térmicos de las reacciones, comienzan con una incubación a 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min y 35 ciclos con un paso de

The citrus species sampled were: sweet orange (*Citrus sinensis* L.), grape fruit (*C. paradisi* M.), lemon (*C. limon* L.) and mandarin (*C. reticulata* B.). Samples were collected from random branches and leaves of mature trees. Total ribonucleic acid (RNA) of the samples was extracted by the Trizol[®] (Molecular Research Center) commercial method and they were analyzed by multiple endpoint RT-PCR and real-time RT-PCR in one step. The primers used in the RT-PCR endpoint reactions are described in Table 2.

The multiple endpoint RT-PCR reactions were carried out in a volume of 25 µL according to Wang *et al.* (2009) with slight modifications. Super Script One step RT-PCR system Taq DNA Polymerase Platinum[®] (Invitrogen) kit was used. In the reaction mixtures, the primers were added at a concentration of 0.2 µM for CDVd, 0.5 µM for CEVd and 0.1 µM for HSVd (Table 2). The protocol consisted of mixing 12.5 µL of buffer 2X, 6.75 µL of a mixture of 6 primers, 0.5 µL of RT-*Taq* enzyme and 150 to 200 ng of ARN (2 µL). The total volume was completed with sterile water free of nucleases. Thermal parameters of the reactions started with a 50 °C incubation for 30 min for the cDNA synthesis, followed by an initial denaturation at 94 °C for 2 min and 35 cycles with a denaturation step at 94 °C for 30 s, an annealing at 58 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 45 s, and a final extension at 68 °C for 7 min. The products of the multiple RT-PCR were analyzed in 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL⁻¹) and visualized on a UV light transilluminator.

The same samples were processed by real time RT-PCR using SYBR Green system with primers specific to CEVd, HSVd and CDVd viroids selected in the previous step. The reactions were carried out in a mixture of 25 µL with the iScript[™] One Step RT-PCR SYBR Green[®] kit (Bio-Rad). The reaction was carried out with a 0.3 mM concentration of the primers. The SYBR Green protocol consisted of 12.5 µL of buffer 2X, 0.75 µL of each primer, 0.5 µL of the iScript RT enzyme, 2 µL of RNA, and total volume was completed with 25 µL of nuclease-free sterile water. Temperature parameters for HSVd and CDVd were the following: 50 °C for 10 min, 95 °C for 5 min, 35 cycles with a denaturation step of 95 °C for 10 s, annealing at 58 °C for 30 s. Temperature parameters for CEVd were the same as

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para el RT-PCR múltiple en un solo paso para tres viroides de cítricos. Table 2. Primers used for multiple RT-PCR in one step for three citrus viroids.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
CEV-R	ccgggatccctgaagga	371	Gross <i>et al.</i> (1982)
CEV-F	ggaaacctggaggaagtgc		
HSVd-R	ccgggctcccttctcaggaagt	302	Sano <i>et al.</i> (1988)
HSVd-F	ggcaactcttctcagaatccagc		
CVd-III-R	cgtcaccaacttagctgccttcgt	269	Sibeburth <i>et al.</i> (2002)
CVd-III-F	gtctccgctagtcggaaagactccg		

desnaturalización a 94 °C durante 30 s, un anillamiento a 58 °C por 30 s, y una extensión a 68 °C por 45 s, además de una extensión final a 68 °C durante 7 min. Los productos de la RT-PCR múltiple fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL⁻¹) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Las mismas muestras fueron procesadas mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green con el uso de iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd, y CDVd, seleccionados en la etapa anterior. Las reacciones fueron realizadas en una mezcla de 25 µL con el kit iScript™ One Step RT-PCR SYBR Green® (Bio-Rad). La reacción fue formada con una concentración de iniciadores de 0.3 µM. El protocolo utilizado de SYBR Green consistió en 12.5 µL de amortiguador 2 X, 0.75 µL de cada uno de los iniciadores, 0.5 µL de enzima iScript RT, 2 µL de ARN y se completó el volumen total a 25 µL con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros de temperatura para HSVd y CDVd fueron los siguientes: 50 °C durante 10 min, 95 °C por 5 min, 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 95 °C por 10 s, anillamiento de 58 °C durante 30 s. Los parámetros de temperatura para CEVd fueron iguales que el anterior con la diferencia que la temperatura de anillamiento fue de 56 °C durante 30 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de RT-PCR tiempo real. Los resultados obtenidos con los iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd y CDVd utilizando los controles positivos fueron satisfactorios. En el caso de CEVd, el umbral de amplificación (Ct) fue rebasado a los 21, 22, 31 y 33 ciclos para las combinaciones de iniciadores (tratamientos) 1, 2, 3 y 4 respectivamente; para HSVd el umbral se rebasó a los 22, 24, 27 y 28 ciclos correspondiendo a los tratamientos 5, 7, 6 y 8; y para CDVd, los valores de Ct fueron 31 y 35 ciclos para los tratamientos 9 y 10 respectivamente (Figura 1). De las cuatro combinaciones de iniciadores utilizadas para CEVd y cuatro para HSVd, dos combinaciones para CEVd y dos para HSVd formaron dímeros de iniciadores de acuerdo con las curvas de disociación (datos no mostrados) lo cual en algunos casos ocasionó una amplificación inespecífica. En el caso de los 3 viroides los controles negativos no rebasaron los umbrales de fluorescencia. Para el análisis de las 90 muestras, se seleccionaron los pares de iniciadores que tuvieron el menor umbral de amplificación (Ct) para cada viroide sin formación de dímeros, en el caso de exocortis se seleccionó la combinación CEVd-5/CEVd-F (tratamiento 1) con un Ct de 21, para cachexia se escogió HSVd-b/CVdII-H1 (tratamiento 5) con un Ct de 22 y para CVd-III la combinación CVd-IIIc/CVd-IIIf (tratamiento 9) con un Ct de 31. La temperatura de anillamiento adecuada para CEVd fue de 56 °C, y para HSVd y CDVd fue de 58 °C; dichas temperaturas funcionaron de manera adecuada para cada uno de los ensayos con los iniciadores seleccionados para cada viroide. Los resultados anteriores coinciden con los trabajos hechos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009), en la utilización del RT-PCR en tiempo real con SYBR Green como método de detección de viroides de los

previous except that the annealing temperature was 56 °C for 30 s.

RESULTS AND DISCUSSION

Standardization of real-time RT-PCR. The results obtained with the primers specific to CEVd, CDVd and HSVd viroids using the positive controls, were satisfactory. For CEVd, the amplification threshold (Ct) was exceeded at 21, 22, 31 and 33 cycles for the primers combinations (treatments) 1, 2, 3 and 4 respectively; for HSVd, the threshold was exceeded at 22, 24, 27 and 28 cycles corresponding to treatments 5, 7, 6 and 8; and for CDVd, Ct values were 31 and 35 cycles for treatments 9 and 10 respectively (Figure 1). From the four primers combinations used for HSVd, and four combinations for CEVd, two of them for CEVd and two for HSVd formed dimers of the primers according to the dissociation curves (data not shown) which in some cases resulted in a non specific amplification. In the case of the 3 viroids, negative controls did not exceed the threshold fluorescence. For the 90 samples analyses, primer pairs with the lowest amplification threshold (Ct) for each viroid without dimer formation were selected; in the case of exocortis, the combination CEVd-5/CEVd-F (treatment 1) with a Ct of 21 was selected; for cachexia, HSVd-b/CVdII-H1 (treatment 5) with a Ct of 22 was chosen and for CVd-III the combination CVd-IIIc/CVd-IIIf (Treatment 9) with a Ct of 31. The annealing temperature suitable for CEVd was 56 °C, and for CDVd and HSVd was 58 °C; such temperatures functioned properly for each of the tests with the primers selected for each viroid. These results coincide with the work done by Tessitori *et al.* (2005) and Rizza *et al.* (2009), about the use of real-time RT-PCR with SYBR Green as detection method for citrus viroids. However, one of the differences of this study was the use of a real time RT-PCR kit in a single step unlike the kit used by the authors mentioned above which used two steps. Therefore, the protocol used here is faster and less likely to contaminate the samples, in addition that the primers used in this work were different from those reported by Tessitori *et al.* (2005) and Rizza *et al.* (2009). In this work it was also possible to obtain the same thermal program for CDVd and HSVd viroids, which can be used for simultaneous analysis of both viroids reducing the detection time.

Analysis of field samples. Regarding multiple end point RT-PCR reactions, from the 90 samples of different citrus species collected in Nuevo Leon and Tamaulipas states, it was clear the CEVd detection, but not CDVd nor HSVd, because the products obtained from the reactions with the primers used were merged together in the gel because they have similar size, although it was possible to differentiate them. From the 90 samples collected and analyzed, 37 were positive for CEVd, 38 to HSVd and 44 to CDVd using conventional multiple RT-PCR (Table 3); however, when corroborating results by RT-PCR with SYBR Green system, it was observed a difference in one sample for CEVd and another one for CDVd, resulting 36 and 43 samples positive, respectively (Figure 2). As for HSVd, the results obtained were the same for both protocols.

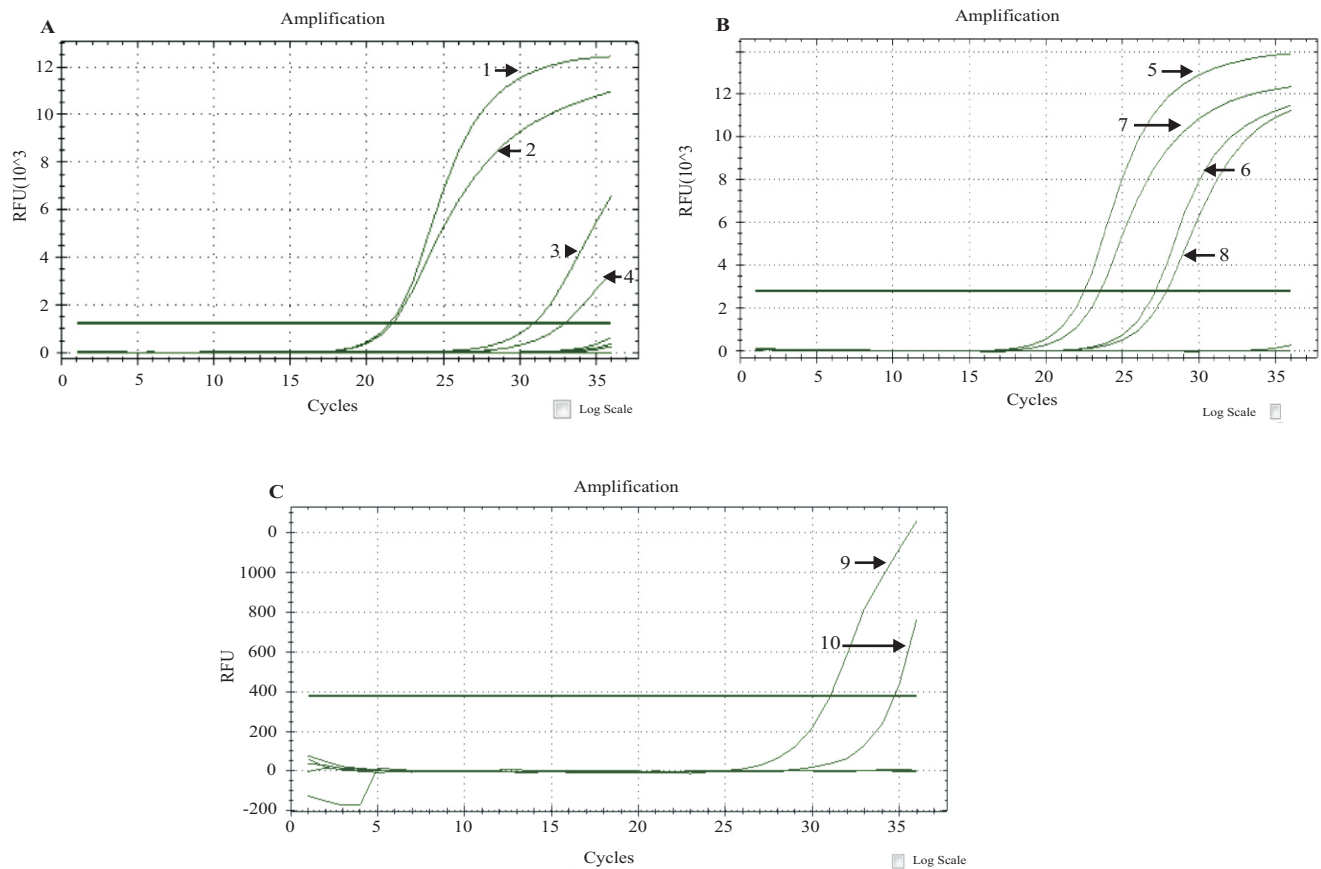


Figura 1. RT-PCR tiempo real con SYBR Green utilizando controles positivos y diferentes combinaciones de iniciadores. A. CEVd: 1. CEVd-5/CEVd-F; 2. CEVd-F/CEVd-b; 3. CEVd-7/CEVd-b; 4. CEVd-5/CEVd-7. B. HSVd: 5. HSVd/CVdII-H1; 6. CCaVd-der/HSVdII-H1; 7. HSVd-b/CV2-AP(+) y 8. CCaVd-der/CV2-AP (+). C. CDVd: 9. CVdIII-C/CVdIII-F y 10. CVdIII-F/CVdIII-R.

Figure 1. Real time RT-PCR with SYBR Green using positive controls and different primers combinations. A. CEVd: 1. CEVd-5/CEVd-F; 2. CEVd-F/CEVd-b; 3. CEVd-7/CEVd-b; 4. CEVd-5/CEVd-7. B. HSVd: 5. HSVd/CVdII-H1; 6. CCaVd-der/HSVdII-H1; 7. HSVd-b/CV2-AP(+) and 8. CCaVd-der/CV2-AP (+). C. CDVd: 9. CVdIII-C/CVdIII-F and 10. CVdIII-F/CVdIII-R.

cítricos. Sin embargo una de las diferencias del presente estudio fue la utilización de un kit de RT-PCR en tiempo real en un solo paso a diferencia de los utilizados por los autores antes mencionados los cuales utilizaron kit en dos pasos. Por lo tanto, el protocolo aquí utilizado es más rápido y tienen menos probabilidad de contaminarse las muestras, además de que los iniciadores aquí utilizados fueron diferentes a los referidos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009). En este trabajo también se logró obtener un mismo programa térmico para los viroides HSVd y CDVd el cual puede ser utilizado en análisis simultáneos de ambos viroides reduciendo el tiempo de detección.

Análisis de muestras de campo. Con respecto a las reacciones de RT-PCR múltiple punto final, de las 90 muestras de diferentes especies de cítricos colectadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, fue clara la detección de CEVd, pero no de HSVd ni de CDVd, ya que los productos obtenidos de las reacciones con los iniciadores utilizados, se empalmaron en el gel debido a que tienen una talla similar aunque si fue posible diferenciarlos. De las 90

In general, the CDVd viroid was present more frequently and with the highest distribution in the study areas, which can be explained by the lack of regulation in Mexico for this viroid; however, CEVd and HSVd viroids also had a high frequency in the samples under study, despite being regulated by the Mexican Official Standards.

CONCLUSIONS

Areal time RT-PCR protocol with SYBR Green system was developed; it is fast, specific and sensitive for the detection of CEVd, HSVd and CDVd citrus viroids. The CEVd-5/CEVd-F; HSVd-b/CVdII-H1 and CVdIII-C/CVdIII-F primers combinations, produced the best results for CEVd, HSVd and CDVd viroids detections, respectively, by using real time RT-PCR with the SYBR Green system. The analysis of 90 citrus samples by multiple end point RT-PCR and real-time RT-PCR with SYBR Green, produced minimal differences in the viroid's detection with differences in only two samples. In the study sites, the trials showed higher incidence of CDVd with

muestras colectadas y analizadas, 37 resultaron positivas a CEVd, 38 a HSVd y 44 a CDVd utilizando la RT-PCR múltiple convencional (Cuadro 3), sin embargo al ser corroboradas mediante el sistema de RT-PCR con SYBR Green se observó una diferencia de una muestra para CEVd y una para CDVd, resultando 36 y 43 muestras positivas respectivamente (Figura 2). En el caso de HSVd, los resultados obtenidos fueron los mismos con ambos protocolos.

En general, el CDVd fue el viroide presente con mayor frecuencia y distribución en las regiones de estudio, lo cual puede explicarse por la falta de regulación en México para este viroide, sin embargo los viroides CEVd y HSVd también tuvieron una frecuencia alta en las muestras de estudio, a pesar de estar regulados por las Normas Oficiales Mexicanas.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green, rápido, específico y sensible para la detección de los viroides de cítricos CEVd, HSVd y CDVd. Las combinaciones de iniciadores CEVd-5/CEVd-F; HSVd-b/CVdII-H1 y CVdIII-C/CVdIII-F, dieron los mejores resultados para la detección de los viroides CEVd, HSVd y CDVd respectivamente, mediante RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. El análisis de 90 muestras de cítricos por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con SYBR Green, tuvieron diferencias mínimas en la detección de los viroides variando sólo en dos muestras. En las localidades de estudio, los ensayos mostraron una mayor incidencia del CDVd con un 49 % del total de muestras analizadas, seguido de 42 % para HSVd y 41 % para CEVd.

Agradecimientos. A la Fundación Produce Tamaulipas proyecto clave: PRECI 3557449^a y al proyecto de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos de la SEP por el financiamiento. Al laboratorio Biociencia S. A. de C. V. por facilitar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación.

Cuadro 3. Incidencia de tres viroides en muestras de cítricos colectadas en varias localidades de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

Table 3. Incidence of three viroids from citrus samples collected at various locations in Nuevo Leon and Tamaulipas states, Mexico.

Estado	Municipio	No. de muestras	Muestras positivas (No/%)		
			CEVd	HSVd	CDVd
Nuevo León	Gral. Terán	26	10/38.5	12/46.2	12/46.2
	Marín	19	2/10.5	0/0	2/10.5
	Montemorelos	10	4/40	10/100	9/90
Tamaulipas	Cd. Victoria	9	2/22.2	4/44.4	4/44.4
	Miguel Hidalgo	21	18/85.7	10/47.6	16/76.2
	RíoBravo	5	1/20	2/40	1/20
Total		90	37/41	38/42	44/49

49 % of all samples analyzed, followed by 42 % for HSVd and 41 % for CEVd.

Acknowledgements. To Fundacion Produce Tamaulipas project code: PRECI 3557449^a and to Fortalecimiento de Cuerpos Académicos (SEP) funding. To Laboratorio Biociencia S. A. de C. V. for providing their facilities to carry out this research project.

LITERATURACITADA

- Almeyda LIH, Iracheta CMM, Jasso AJ, Curti DSA, Ruiz BP and Rocha PMA. 2002. Re-examination of citrus viroids in tahiti lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 152-160.
- Almeyda LIH, Rocha PMA, Iracheta CMM, Orona CF y Kahlke CJ. 2005. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia* 41: 87-93.
- Alvarado GOG, Rocha PMA, Silva VS, Martínez SJP, Lee RF, Rivera BR and Ruiz BP. 2000. Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México. Pp:289-293. *In: da Graca JV, Lee RF and Yokomi RK (eds.). Proceedings of the 14th IOCV Conference.* Riverside, CA. 436p.
- Bagherian SSA and Izadpanah K. 2010. Two novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. Pp:105-113. *In: 21st International Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops.*
- Bernard L and Duran Vila N. 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. Pp:452-455. *In: Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). Proceedings of the 16th IOCV Conference.* Riverside, CA. 517p.
- Diener TO. 1979. Viroids and Viroid Diseases. Editorial Wiley-Interscience. 245 p.
- Duran Vila N, Pina JA, Ballester JF, Juarez J, Roistacher CN, Rivera BR and Semancik JS. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *In: Timmer LW, Garnsey SM and Navarro L (eds.).*

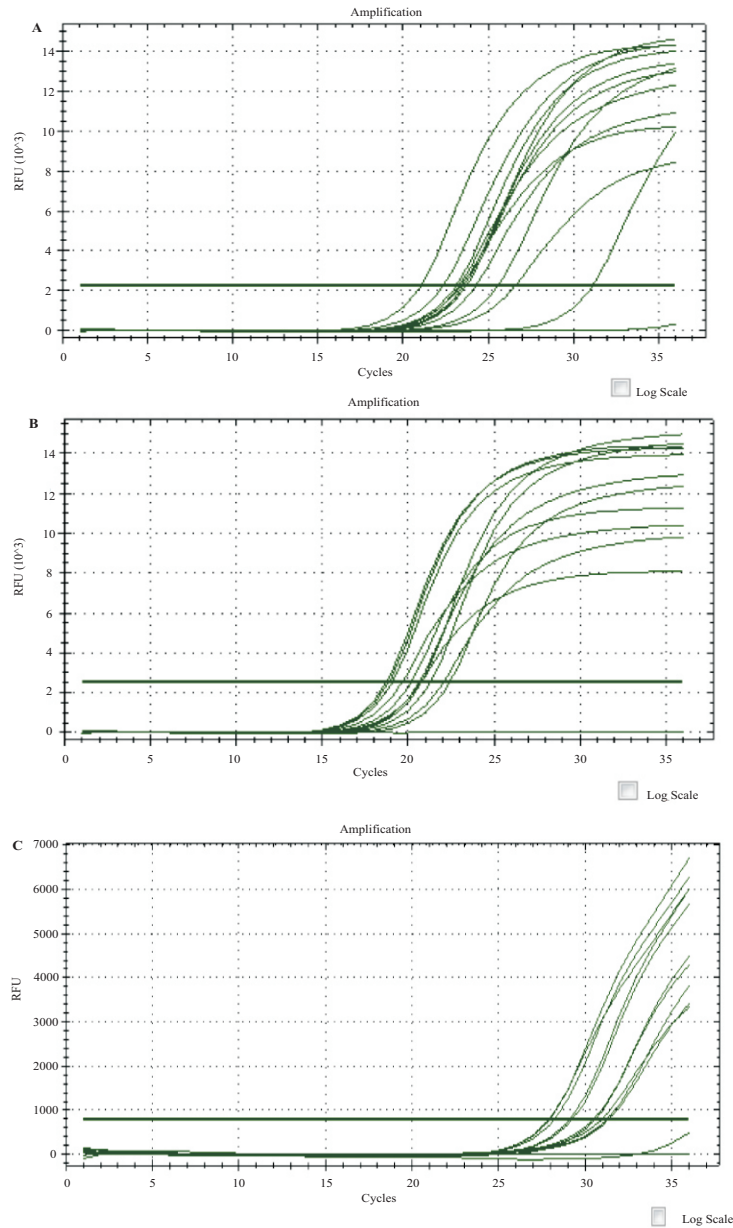


Figura 2. RT-PCR tiempo real con SYBR Green en muestras de cítricos de campo. A. CEVd. B. HSVd. C. CDVd. Cada curva sigmoide corresponde a una muestra de campo.

Figure 2. Real-time RT-PCR with SYBR Green in field citrus samples. A. CEVd. B. HSVd. C. CDVd. Each sigmoid curve corresponds to a field sample.

Proceedings of the 10th IOCV Conference. Riverside, CA. 428p.

Flores R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C. R. Acad. Sci. III* 324: 943-952.

Gross HJ, Krupp G, Domdey H, Raba M, Jank P, Lossow C, Alberty H, Ramm K and Sanger HL. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroids. *European Journal Biochemistry* 121:249-257.

Hadidi A, Flores R, Randles WJ and Semancik SJ. 2003. *Viroids*. CSIRO Publishing. 392p.

Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, Ito T, Isaka M and Kano T. 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.

Levy L and Hadidi A. 1993. Direct nucleotide sequencing of PCR amplified DNAs of the closely related citrus viroids Ila and Ilb (Cachexia). Pp. 180-186. *In*: Moreno P, da Graça JV and Timmer LW (eds.). *Proceedings 12th Conference IOCV, Riverside, CA.* 471p.

Malfitano M, Barone M, Duran Vila N and Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 87:

- 115-121.
- Mohamed ME, Bani HSM, Dafalla G, Bove JM and Duran Vila N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *Journal of Plant Pathology* 91: 185-190.
- Önelge N. 2010. Citrus viroids in Turkey. Pp. 225-226. *In*: Hilf ME, Timmer LW, Milne RG and da Graça JV (eds.). Proceedings of the 17th Conference IOCV, Riverside, CA. 275p.
- Palacio BA, Foissac X and Duran Vila D. 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *European Journal of Plant Pathology* 105: 897-903.
- Rizza S, Nobile G, Tessitori M, Catara A and Conte E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology* 58: 118-185.
- Sano T, Hataya T and Shikata E. 1988. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Research* 16:347.
- Sieburth PJ, Irely M, Garnsey SM and Owens RA. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. Pp. 230-239. *In*: Duran Vila N, Milne RG, and da Graça JV (eds.). Proceedings of the 15th IOCV Conference. Riverside, CA. 456p.
- Tessitori M, Rizza S, Reina A and Catara A. 2005. Real-Time RT-PCR based on SYBR-Green I for the detection of citrus exocortis and citrus cachexia diseases. Pp. 456-459. *In*: Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). Proceedings of the 16th IOCV Conference. Riverside, CA. 517p.
- Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd edition. The American Phytopathological Society. 88 p.
- USDA. 2012. CITRUS: World markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (consulta julio de 2012).
- Verniere C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C, Bové JM and Duran Vila N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology* 96: 356-368.
- Vidalakis G, Gumpf DJ, Bash JA and Semancik JS. 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
- Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y and Li K. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal Plant Pathology* 124: 175-180.

Aporte de Microorganismos Benéficos por la Incorporación al Suelo de Residuos Deshidratados de Col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su Efecto en el pH

Contribution of Beneficial Microorganisms Due to Soil Amendments of Dried Cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) Residues and its Effect on pH Soil

Karla Alejandra Rodríguez Millán, Clara Teresa Monreal Vargas, Jesús Huerta Díaz, José Carmen Soria Colunga y Ramón Jarquín Gálvez, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, km 14.5 Carr. San Luis-Matehuala, Apdo. Postal 32., Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, CP 78321, México. Correspondencia: clara.monreal@uaslp.mx

(Recibido: Marzo 05, 2013 Aceptado: Mayo 23, 2013)

Rodríguez Millán KA, Monreal Vargas CT, Huerta Díaz J, Soria Colunga JC y Jarquín Gálvez R. 2013. Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su efecto en el pH. Revista Mexicana de Fitopatología 31:29-44.

Resumen. Se plantea que los residuos deshidratados de col aportan microorganismos antagonistas hacia fitopatógenos y modifican el PH del suelo. Se utilizaron residuos de col deshidratados al sol, envasados y preservados en un ambiente seco, por dos y cinco años. Éstos se analizaron microbiológicamente, se evaluó su efecto sobre el pH de un suelo estéril durante 30 d, y se estableció el tipo y número de microorganismos que pueden incorporar. También se determinó su efecto sobre el pH, características físicas, químicas y biológicas, en cinco suelos sin esterilizar, durante 51 d. En los residuos predominaron *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. *In vitro*, *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraron antibiosis contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersi*. *Trichoderma* y *Bacillus* fueron micoparásitos de estos hongos respectivamente. En el suelo estéril, los residuos incrementaron el pH de 7.57 a 8.79; y favorecieron el desarrollo de bacterias (160×10^7 ufc g⁻¹ de suelo), principalmente de *Bacillus* y *Pseudomonas*. En cuatro de los suelos no estériles, el pH siempre fue significativamente ($P \leq 0.05$) menor al testigo y varió dinámicamente entre 7.33 y 8.24; se incrementó el contenido de nitrógeno asimilable, potasio, bacterias g⁻¹ de suelo; se incorporaron *Bacillus* y *Pseudomonas*; y se promovió el desarrollo de *Penicillium*.

Palabras clave adicionales: Modificadores orgánicos de suelos, microorganismos antagonistas, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

Abstract. It is suggested that cabbage dry residues provide antagonist microorganisms to plant pathogens and they modify the pH of the soil. We used cabbage sun-dried residues, packaged and preserved in a dry environment for two and five years. They were analyzed microbiologically, and their effect on the pH of a sterile soil for 30 d, and the type and number of microorganisms they can incorporate were studied. We also determined its effect on pH, the physical, chemical and biological characteristics in five unsterilized soils for 51 d. In the residues, the *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. predominated. *In vitro*, *Bacillus* and *Pseudomonas* showed antibiosis against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersi*. *Trichoderma* and *Bacillus* were mycoparasites of these fungi respectively. In sterile soil, residues increased the pH from 7.57 to 8.79, and favored the development of bacteria (160×10^7 ufc g⁻¹ soil), mainly from *Bacillus* and *Pseudomonas*. In four of the non-sterile soils, the pH was always significantly ($P \leq 0.05$) lower than the control and ranged dynamically between 7.33 and 8.24; the content of assimilable nitrogen, potassium, and the bacteria g⁻¹ in soil were increased; *Bacillus* and *Pseudomonas* were incorporated; and the development of *Penicillium* was promoted.

Additional keywords: organic soil amendments, antagonistic microorganisms, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

The soilborne plant pathogens (SPP) cause diseases in economically important crops that originate production losses. Various strategies have been developed for management these microorganisms, such as biological control and production of soils with biological, chemical and physical characteristics against pathogens through incorporation of organic residues (Cook and Baker, 1983).

Los fitopatógenos habitantes del suelo (FHS) ocasionan enfermedades en cultivos de importancia económica que originan pérdidas en la producción. Se han desarrollado diversas estrategias para el manejo de estos microorganismos, como el control biológico y la generación de suelos con características biológicas, químicas y físicas adversas a los patógenos, a través de la incorporación de residuos orgánicos (Cook y Baker, 1983). Los residuos orgánicos más utilizados por sus propiedades biodesinfectantes (antaño biofumigantes) son los de crucíferas, lo cual se debe a que los tejidos de estas plantas contienen una elevada cantidad de compuestos azufrados denominados glucosinolatos (Krikegaard y Sarwar, 1998). La enzima glucohidrolasa tioglucósido (mirosinasa) hidroliza a estos compuestos y los transforma en los compuestos volátiles tóxicos isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, tio-oxazolidinas y eptionitrilos; dependiendo de la especie de crucífera (Brown y Morra, 2005). En los tejidos intactos la enzima se encuentra asociada a la membrana de la célula y separada de los glucosianolatos; y sólo actúa cuando los tejidos vegetales sufren una autólisis o cuando se fermentan. Los residuos se pueden incorporar frescos o secos, siempre que se evite el daño e hidrólisis endógena por la mirosinasa, antes de ser aplicados. Los residuos de col son una buena opción para el manejo de FHS debido a que su acción biocida o biostática no se debe únicamente a los glucosionolatos, sino también a otros compuestos tóxicos como amoniaco, nitratos, ácido nítrico, ácido sulfhídrico, ácidos orgánicos, enzimas proteolíticas y quitinolíticas; que los microorganismos generan durante la descomposición de la materia orgánica que los constituye, además de aumentar la población de microorganismos con características antagonistas a los FHS (Lazarovits *et al.*, 2005). En diversos estudios se ha comprobado que los residuos deshidratados de la col (RDC) preservan sus propiedades biodesinfectantes y pueden suprimir hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Aphanomyces eutiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Hoitink y Boehm, 1999; Lazzeri *et al.*, 2004). Las investigaciones sobre diversas especies de crucíferas se han centrado en determinar el tipo y concentración de glucosinolatos que poseen (Mayton *et al.*, 1996; Smolinska *et al.*, 1997; Kirkegaard y Sarwar, 1998; Matthiessen y Shackleton, 2005), en el efecto variable que tienen los compuestos volátiles tiocianatos e isitiocianatos sobre los FHS, que va desde disminuir el número de propágulos y la severidad de diversas enfermedades, hasta un efecto nulo (Muehlchen *et al.*, 1990; Mojtahedi *et al.*, 1991; Zasada *et al.*, 2003; Snapp *et al.*, 2007; Njoroge *et al.*, 2008); en evaluar el efecto de los residuos frescos y deshidratados, solos y en combinación con solarización (Ramírez-Villapudua y Munnecke, 1987; Ramírez-Villapudua y Munnecke, 1988; Gamliel y Stapleton, 1993; Coelho *et al.*, 1999); y en establecer los factores que favorecen la biodesinfección y la vida media de los tiocianatos e isitiocianatos en el suelo, la cual no es mayor a 12 días (Brown *et al.*, 1991; Brown y Morra, 1997; Gardiner *et al.*, 1999; Morra y Kirkegaard, 2002; Gimsing y Kirkegaard,

Most used organic residues - because of their biodesinfectant properties (formerly biofumigants) are those from cruciferous, because the tissues of these plants contain a high amount of sulfur compounds known as glucosinolates (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Thioglucoside glucohydrolase enzyme (myrosinase) hydrolyzes these compounds and transform them into toxic volatile compounds such as isothiocyanates, nitriles, thiocyanates, oxazolidinethione and eptionitriles, depending on the cruciferous species (Brown and Morra, 2005). In intact tissue the enzyme is associated with the cell membrane and separated from the glucosinolates; and it only acts when the plant tissues undergo autolysis or when fermented. Residues can be incorporated fresh or dried, as long as damage and hydrolysis by endogenous myrosinase are avoided before application. Cabbage residues are a good option for SPP control because their biocide or biostatic activity is not only due to the glucosinolates, but also to other toxic compounds such as ammonia, nitrates, nitric acid, sulfhydryc acid, organic acids and proteolytic and chitinolytic enzymes that microorganisms produce during decomposition of its own organic matter; besides increasing the population of microorganisms with antagonistic characteristics to the SPP (Lazarovits *et al.*, 2005). Several studies have shown that the dried cabbage residues (DCR) keep their biodesinfectants properties and they can suppress pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Aphanomyces eutiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, among others (Hoitink and Boehm, 1999; Lazzeri *et al.*, 2004). Research on various cruciferous species has been focused mainly on determining the type and concentration of glucosinolates present (Mayton *et al.* 1996; Smolinska *et al.* 1997; Kirkegaard and Sarwar, 1998; Matthiessen and Shackleton, 2005); on the variable effect of thiocyanate and isothiocyanates volatiles on SPP, ranging from reducing the number of propagules and severity of various diseases up to a null effect (Muehlchen *et al.*, 1990; Mojtahedi *et al.*, 1991; Zasada *et al.*, 2003; Snapp *et al.*, 2007; Njoroge *et al.*, 2008); on evaluation of the effect of fresh and dried residues, alone and in combination with solarization (Ramírez-Villapudua and Munnecke, 1987; Ramírez-Villapudua and Munnecke, 1988; Gamliel and Stapleton, 1993, Coelho *et al.*, 1999); and in establishing the factors that favor the biodesinfection and the average life of thiocyanates and isothiocyanates on the soil, which is not more than 12 d (Brown *et al.*, 1991; Brown and Morra, 1997; Gardiner *et al.*, 1999; Morra and Kirkegaard, 2002; Gimsing and Kirkegaard, 2006). It was noted that the biocidal activity of thiocyanates and isothiocyanates is only short-term, and that the suppressive effect of cruciferous residues in the long term is due to other mechanisms, among them, it has been proposed the increase of antagonist populations such as *Streptomyces* and *Pseudomonas fluorescens* (Cohen *et al.*, 2005). Motisi *et al.* (2009) suggested the late induction of microbial populations that can generate other biocidal compounds. On the other hand, the pH is one of the environmental factors influencing microbial growth, each microbial population has a pH range where growth is

2006). Se ha señalado que la actividad biocida de los tiocianatos e isotiocianatos tiene un corto plazo, y que el efecto supresivo de los residuos de crucíferas a largo plazo se debe a otros mecanismos, entre ellos se ha propuesto el incremento de poblaciones antagonistas como *Streptomyces* y *Pseudomonas fluorescens* (Cohen *et al.*, 2005). Motisi *et al.* (2009) sugieren la inducción tardía de poblaciones microbianas que pueden generar otros compuestos biocidas. Por otro lado, el pH es uno de los factores ambientales que influye en el crecimiento microbiano, cada población microbiana tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido, con variaciones en un margen de 2 a 3 unidades; sin embargo, algunos microorganismos son muy sensibles y no toleran ningún cambio. Además el pH del suelo afecta significativamente la actividad enzimática microbiana y es por ello que una de las estrategias que se puede utilizar en conjunto con otras, para el manejo de los FHS, es la regulación del pH a niveles no tolerados por éstos. El pH del suelo puede tener un doble efecto, impedir el crecimiento microbiano, y en el caso de los residuos biodesinfectantes, propiciar la formación de compuestos tóxicos. Por ejemplo, la descomposición microbiológica de residuos con un alto contenido de nitrógeno provoca una acumulación de amonio y un incremento del pH del suelo. Cuando el pH es mayor de 8.5 parte del amonio se convierte en amoniaco. El amonio no es tóxico, incluso a altas concentraciones, mientras que el amoniaco es muy tóxico (Tenuta y Lazarovits, 2002a). El amonio en los suelos con alto contenido en carbono orgánico no se acumula, convirtiéndose rápidamente por los procesos de nitrificación en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-) (Tenuta y Lazarovits, 2002b). De manera colateral el pH influye en la eficacia del control de las enfermedades cuando se utilizan residuos orgánicos debido a que se ha encontrado que sólo existen productos tóxicos que sean letales para los patógenos cuando el pH del suelo está por debajo de 6 o sobre 8; por ello, los cambios en el pH pueden influir en el grado de control (Tenuta y Lazarovits, 2004). En esta investigación se plantea que además de los biocidas volátiles, los mecanismos supresivos de los RDC se deben a que poseen una microflora antagonista a los FHS, modifican el pH e incrementan las poblaciones microbianas benéficas en el suelo, lo que genera condiciones adversas a los FHS. El objetivo fue determinar si los residuos deshidratados de col aportan microorganismos benéficos que sean antagonistas a los fitopatógenos y su período de viabilidad en ellos, así como su efecto sobre el pH del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Residuos deshidratados de col. Los residuos deshidratados de col (*Brassica oleraceae* var *capitata*) se obtuvieron picando el follaje finamente, se secaron por exposición a la radiación solar durante ocho días, posteriormente se molieron para obtener residuos con una textura más fina pero sin llegar a polvo, se envasaron en frascos de plástico y se almacenaron en un ambiente seco. Se dispuso de tres tipos de residuos: uno de preparación reciente (RDC1) y dos almacenados durante dos y cinco años (RDC2 y RDC5, respectivamente).

possible and usually has a well-defined optimum pH with variations in a range of 2 to 3 units; however, some microorganisms are very sensitive and they cannot tolerate any change. Besides, soil pH significantly affects microbial enzyme activity and that is why one of the strategies that can be used in conjunction with others to management SPP, is the regulation of pH to levels not tolerated by them. Soil pH can have a double effect, prevent microbial growth, and in the case of biodesinfectants residues, to promote the formation of toxic compounds. For example, microbiological decomposition of residues with a high nitrogen content causes ammonium accumulation and an increase in the soil pH. When pH is higher than 8.5 part of ammonium is converted into ammonia. Ammonium is not toxic, even at high concentrations, while ammonia is very toxic (Tenuta and Lazarovits, 2002a). Ammonium in soils with high organic carbon content does not accumulate, rather, it rapidly converts due to nitrification processes to nitrite (NO_2^-) and then to nitrate (NO_3^-) (Tenuta and Lazarovits, 2002b). In a similar way, the pH influences the efficiency of disease control only when organic residues are used because it has been found that there are toxic products that are lethal to the pathogens only when the soil pH is below 6 or above 8; therefore, changes in pH can affect the degree of control (Tenuta and Lazarovits, 2004). In the present study it is suggested that in addition to the volatile biocides, the DCR suppressive mechanisms are due to the SPP antagonistic microflora that modify the pH and increase the beneficial microbial population in the soil, which leads to adverse conditions for SPP. The aim was to determine if the dried cabbage residues can provide beneficial microorganisms that are antagonistic to plant pathogens and their period of viability on them, as well as their effect on soil pH.

MATERIALS AND METHODS

Dried cabbage residues. Cabbage (*Brassica oleraceae* var *capitata*) dehydrated residues were obtained by finely chopping the foliage, drying by exposure to sunlight during eight days, and then grounded until obtaining residues with a finer texture but without becoming powder, they were packaged in plastic bottles and stored in a dry environment. There were three types of residues obtained: one fresh preparation (DCR1) and two stored during two and five years (DCR2 and DCR5, respectively).

Microflora associated to DCR, viable units and identification of most abundant microorganisms. Cultivable microflora associated to DCR1 and to the cultivable viable units in DCR2 and DCR5 were determined with the classic microbiological growth technique and plate count (Barre and Harwood, 1999; Oliver, 2005), based on the dilution method and spread over the entire surface of potato dextrose agar (PDA) culture media, peptone yeast extract glucose agar (YPGA) and Czapeck (Cz). Decimal dilutions were made from one gram of DRC, 0.1 mL of 10^1 to 10^4 were inoculated and incubated at 28 °C in a growth chamber. For each dilution and each medium there were three replicates. Colony forming units (cfu) per gram of DCR were determined by the number of fungal and bacterial

Microflora asociada a los RDC, unidades viables e identificación de los microorganismos más abundantes.

La microflora cultivable asociada a RDC1 y las unidades viables cultivables en RDC2 y RDC5 se determinaron con la técnica microbiológica clásica de crecimiento y conteo en placa (Barer y Harwood, 1999; Oliver, 2005), basada en el método de dilución y siembra por extensión en los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), extracto de levadura peptona glucosa agar (YPGA) y Czapeck (Cz). Las diluciones decimales se efectuaron a partir de un gramo de RDC, se sembraron 0.1 ml de 10^1 a 10^7 , y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Para cada dilución y cada medio se realizaron tres repeticiones. Las unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de RDC, se determinaron por el número de colonias fúngicas y bacterianas desarrolladas desde las 24 h y hasta los seis días. De las poblaciones predominantes se obtuvieron las cepas puras. Los hongos se identificaron por medio de sus estructuras microscópicas observadas con un microscopio óptico Karl Zeiss, y con base en las referencias de Barnett y Hunter (1972), así como Alexopoulos *et al.* (1996). En el caso de las bacterias, se caracterizó la morfología macroscópica, y la microscópica a través de la tinción de Gram. La identificación a nivel de género se llevó a cabo con las pruebas básicas de Cowan y Steel (Cowan *et al.*, 1993), además de la prueba de KOH, expresión de fluorescencia en el medio B de King y crecimiento en el medio selectivo agar cetrimida. Con los microorganismos predominantes identificados, se efectuaron pruebas de confrontación en PDA y YPGA, contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) y *Rhizoctonia solani*, para detectar si alguno de ellos es antagónico hacia estos hongos fitopatógenos. Los patógenos se sembraron en forma masiva, y en el centro los posibles antagonistas; incubándose las cajas a 28 °C por 24 a 72 h, en una cámara de crecimiento. El antagonismo se evaluó por halos de inhibición del crecimiento, lisis del micelio y tasa de crecimiento colonial radial.

Incorporación de poblaciones microbianas por adición de RDC a un suelo estéril y su efecto sobre el pH.

El suelo utilizado se colectó en el municipio de Moctezuma, SLP. Éste se esterilizó en autoclave a 121 °C h⁻¹, tres veces, cada tercer día. Antes de iniciar el ensayo, se midió el pH con el potenciómetro, en una dilución 1:10 obtenida a partir de muestras de un gramo de suelo. Se confirmó la esterilidad por el conteo en placa de unidades viables en las diluciones 10^1 a 10^7 , y por siembra de 10 gránulos de suelo (0.5 cm de diámetro) por caja, en 10 cajas de PDA, YPGA y Cz. Éstas se incubaron a 28 °C por ocho días, en una cámara de crecimiento. Cinco gramos de residuos RDC2 o RDC5 se incorporaron en 500 g de suelo estéril contenido en recipientes de unicel, se humedecieron con agua destilada estéril a capacidad de campo, se sellaron perfectamente con papel aluminio y parafilm, y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Por cada tipo de residuo se efectuaron tres repeticiones y los testigos respectivos fueron preparados de la misma forma pero sin RDC. Después de 24 h y hasta los seis días se cuantificaron las poblaciones microbianas mediante la técnica de conteo en placa, a partir de diluciones y siembra por extensión en PDA, YPGA y Cz.

colonies developed from 24 h up to six days. Pure strains were obtained from predominant populations. Fungi were identified by their microscopic structures observed with a Karl Zeiss optical microscope, and based on the references of Barnett and Hunter (1972) and Alexopoulos *et al.* (1996). In the case of bacteria, macroscopic morphology was characterized and the microscopic morphology with the Gram stain. The identification at the genus level was carried out with Cowan and Steel (Cowan *et al.*, 1993) basic tests, besides KOH test, fluorescence expression in the King B medium and growth in the cetrimide agar selective medium. With the predominant microorganisms identified, confrontation tests were done in PDA and YPGA against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) and *Rhizoctonia solani* to detect if any of them was antagonistic towards any of these fungal pathogens. Pathogens were spread in massive form, and at the center the potential antagonists; plates were incubated at 28 °C for 24 to 72 h in a growth chamber. Antagonism was assessed by growth inhibition halos, lysis of the mycelium and radial colony growth rate.

Incorporation of microbial populations by addition of DCR to a sterile soil and its effect on pH.

The soil used was collected in the Moctezuma municipality, SLP. It was autoclaved at 121 °C hr⁻¹, three times every other day. Before starting the test, the pH was measured with the potentiometer at a 1:10 dilution of a sample obtained from a gram of soil. Sterility was confirmed by plate count of viable units of the 10^1 to 10^7 dilutions, and by inoculation 10 pellets of soil (0.5 cm diameter) per plate, in 10 plates of PDA, YPGA and Cz. These plates were incubated at 28 °C for eight days in a growth chamber. Five grams of DCR2 or DCR5 residues were incorporated into 500 g of sterile soil kept in styrofoam containers, they were moistened with sterile distilled water at field capacity and perfectly sealed with aluminum foil and parafilm, and incubated at 28 °C in a chamber growth. For each type of residue three repetitions were made and the respective controls were prepared in the same way but without DCR. After 24 h and up to six days, the microbial populations were quantified by plate count technique from dilutions and spread over the entire surface of PDA, YPGA and Cz. The dilutions inoculated were 10^3 to 10^7 , with three replicates per dilution and culture medium. In order to know the effect of pH on the DCR, it was measured at 1, 5, 9, 12, 15, 20, 23, 26 and 30 d, as described above. The obtained data were statistically analyzed with Student's t-test.

Effect of DRC on pH and microflora of different types of non-sterile soil.

Five soils samples from San Luis Potosi (Villa de Arista, two samples), Veracruz (one sample) and Zacatecas (two samples) were used. These were analyzed to determine their physical (data not shown) and chemical characteristics with the classical techniques described by Reeuwijk (2002) - pH in distilled water as well as in 1M KCl at a 1:2.5 ratio, electrical conductivity, bulk density, texture, assimilable nitrogen with NaOH, assimilable potassium with ammonium acetate and organic matter percentage. Each soil microflora was determined in cfu g⁻¹ soil with the plate count technique described above. Decimal dilutions were made from 10^1 to 10^6 and 0.1 mL of

Las diluciones sembradas fueron 10^3 a 10^7 , con tres repeticiones por dilución y medio de cultivo. Para conocer el efecto de los RDC sobre el pH, éste se midió a los: 1, 5, 9, 12, 15, 20, 23, 26 y 30 d, de la forma antes descrita. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con una prueba t de Student.

Efecto de los RDC sobre el pH y la microflora de diferentes tipos de suelo no estériles. Se utilizaron cinco suelos provenientes de San Luis Potosí (Villa de Arista, dos muestras), Veracruz (una muestra) y Zacatecas (dos muestras). Éstos se analizaron para determinar sus características físicas (datos no presentados) y químicas con las técnicas clásicas descritas por Reeuwijk (2002) para pH en agua destilada así como en KCl 1M en una relación 1:2.5, conductividad eléctrica, densidad aparente, textura, nitrógeno asimilable con NaOH, potasio asimilable con acetato de amonio y por ciento de materia orgánica. La microflora de cada suelo se determinó en ufc g^{-1} de suelo, con la técnica de conteo en placa antes descrita. Se efectuaron diluciones decimales de 10^1 a 10^6 y se sembraron 0.1 mL de las diluciones 10^4 , 10^5 , y 10^6 en los medios PDA, PDA acidulado y YPGA; posteriormente se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. El conteo de colonias se realizó después de 24 h y hasta los seis días. Se realizaron tres repeticiones por cada dilución y por cada medio de cultivo. El tratamiento consistió en incorporar cinco gramos de RDC2 en 500 g de suelo contenido en recipientes de unicel y se humedecieron con agua destilada estéril a capacidad de campo. Se sellaron perfectamente con papel aluminio y parafilm, y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Por cada tipo de suelo se realizaron tres repeticiones y el testigo correspondiente. Durante todo el ensayo, el suelo se mantuvo húmedo a capacidad de campo. El pH se registró durante 51 d. En los primeros cinco días las evaluaciones fueron diarias, posteriormente cada tercer día y en las últimas dos semanas cada dos días. Los valores de pH promedio de las tres repeticiones se analizaron estadísticamente con la prueba t para medias de dos muestras emparejadas. Al final del ensayo se determinaron las características físicas (datos no presentados), químicas y microbiológicas de los suelos con las técnicas ya mencionadas; y los valores obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student para dos muestras emparejadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microflora asociada a los RDC, unidades viables e identificación de los microorganismos más abundantes. La microflora cultivable asociada a los RDC1 estuvo constituida por hongos y bacterias que crecieron en los medios de PDA y YPGA pero no en Czapeck. Se determinó una población bacteriana de 20×10^6 ufc y fúngica de 15×10^5 ufc g^{-1} de RDC. Las poblaciones bacterianas predominantes fueron *Pseudomonas* y *Bacillus*, identificadas con base en las características morfológicas microscópicas y pruebas bioquímicas básicas (Cuadro 1). *Pseudomonas* creció preferentemente en PDA (Figura 1A), y produjo un pigmento fluorescente tanto en agar cetrimida como en el medio B de King, lo que indica que es una pseudomonas del

the 10^4 , 10^5 , and 10^6 dilutions were inoculated in PDA, acidified PDA and YPGA media; then they were incubated at 28 °C in a growth chamber. The colony count was performed after 24 h and up to six days. Three replicates for each dilution and for each medium were carried out. The treatment consisted on incorporating five grams of DCR2 in 500 g of soil contained in styrofoam containers and moistened with sterile distilled water to field capacity. They were perfectly sealed with aluminum foil and parafilm, and they were incubated at 28 °C in a growth chamber. For each soil type there were three replicates and the corresponding control. Throughout the test, the soil was kept moist at field capacity. The pH was recorded during 51 d. In the first five days the evaluations were daily, then every other day and in the last two weeks every two days. The average pH values of the three replicates were statistically analyzed with the t-test for paired means of two samples. At end of the study, the physical (data not shown), chemical and microbiological characteristics of the soils were determined with the techniques mentioned above; the obtained values were statistically analyzed with Student's t-test for two paired samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Microflora associated to DCR, viable units and identification of most abundant microorganisms. The cultivable microflora associated to DCR1 consisted of fungi and bacteria grown on PDA and YPGA but not Czapeck media. Bacterial population was 20×10^6 cfu and fungal population 15×10^5 cfu g^{-1} of DCR. The predominant bacterial populations were *Pseudomonas* and *Bacillus*, as they were identified based on microscopic morphological characteristics and basic biochemical tests (Table 1). *Pseudomonas* grew preferably on PDA (Figure 1A), and it produced a fluorescent pigment in both cetrimide agar and King B media, which indicates that the group is a fluorescent pseudomonas. *Bacillus* grew on YPGA but not on PDA (Figure 1B). The fungi were identified by their microscopic structures and the main fungal populations corresponded to *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Rhizopus*; and predominant gender was *Trichoderma*. For DCR2 and DCR5 the same amount of viable culturable bacteria units (6×10^4 cfu g^{-1} DCR) and fungi (1×10^4 cfu g^{-1} DCR) was obtained, which indicates the existence of bacterial and fungal species preserved dehydrated during five years. The only viable bacteria were fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* sp.; as for fungi only *Penicillium* and *Alternaria*, being *Penicillium* the predominant fungal population. The fungi and bacteria genera identified in the recent and preserved DCR, are among the most common found in most organic residues, the prevalence or absence of some of them depends on the type of residue, for example, *Aspergillus* is one of the predominant fungi in alfalfa residues, *Trichoderma* and *Penicillium* in fish flour, and *Aspergillus* and *Trichoderma* in mushroom compost (Nico *et al.*, 2005). In vermicompost obtained from horse manure and plant matter with California earthworms and in sandy loam soil, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* were found (Guedez *et al.*, 2009). Residues from banana, cattle

Cuadro 1. Características morfológicas y bioquímicas que identifican a *Bacillus* y *Pseudomonas* como parte de las poblaciones microbianas asociadas a los RDC.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics that identify *Bacillus* and *Pseudomonas* as part of the microbial populations associated to the DCR.

Características morfológicas y prueba bioquímica	Bacteria 1 <i>Pseudomonas</i>	Bacteria 2 <i>Bacillus</i>
Morfología y tinción de Gram	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+)
Prueba de KOH	+	-
Ácido-alcohol resistente	-	-
Presencia de endospora (central/terminal)	-	+ central
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	-
Metabolismo O/F	Oxidativo	F/-
Crecimiento aerobio/anaerobio	Aerobio	Aerobio
Producción de ácido a partir de la glucosa	-	+
Movilidad	+	-

O: Metabolismo oxidativo

F: Metabolismo fermentativo (algunas cepas fueron fermentativas y otras negativas)

grupo fluorescente. *Bacillus* creció en YPGA pero no en PDA (Figura 1B). Los hongos se identificaron por sus estructuras microscópicas y las principales poblaciones fúngicas correspondieron a *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Rhizopus*; y el género predominante fue *Trichoderma*. Para RDC2 y RDC5, se obtuvo la misma cantidad de unidades viables cultivables de bacterias (6×10^4 ufc g^{-1} de RDC) y de hongos (1×10^4 ufc g^{-1} de RDC), lo cual indica la existencia de especies bacterianas y fúngicas que se conservan en deshidratación por cinco años. Las bacterias viables fueron únicamente *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *Bacillus* sp.; y los hongos *Penicillium* y *Alternaria*, siendo *Penicillium* la población fúngica predominante. Los géneros de hongos y bacterias identificados en los RDC recientes y conservados, están dentro de los más comunes que se han encontrado en la mayoría de las enmiendas orgánicas, el predominio o ausencia de algunos de ellos depende del tipo de enmienda, por ejemplo *Aspergillus* es uno de los hongos predominantes en enmiendas de alfalfa, *Trichoderma* y *Penicillium* en harina de pescado, y *Aspergillus* y *Trichoderma* en composta de champiñón (Nico *et al.*, 2005). En lombricomposta obtenida con lombriz californiana en suelo franco-arenoso a partir de excremento de caballo y materia vegetal, se encontró a *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Guédez *et al.*, 2009). Las enmiendas de residuos de plátano, estiércol bovino, pulpa de café y gallinaza se caracterizan por poblaciones bacterianas constituidas principalmente por diversas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, además de *Aspergillus* y *Penicillium* (Escobar *et al.*, 2012). Atlas y Bartha (2005) refieren que los géneros de bacterias y hongos identificados en los RDC y en las diversas enmiendas orgánicas son los más abundantes debido a su versatilidad metabólica para degradar monosacáridos, disacáridos, almidón, celulosa y hemicelulosa; así como los compuestos nitrogenados orgánicos.

En las pruebas de confrontación *in vitro*,

by bacterial populations consisting mainly of various manure, poultry manure and coffee pulp are characterized species of *Bacillus* and *Pseudomonas*, as well as *Aspergillus* and *Penicillium* (Escobar *et al.*, 2012). Atlas and Bartha (2005) reported that the bacteria and fungi genera identified in the DCR and in various organic residues are the most abundant due to their metabolic versatility to degrade monosaccharides, disaccharides, starch, cellulose and hemicellulose, as well as organic nitrogen compounds.

In vitro's confrontation tests, *Pseudomonas* showed antibiosis only against *R. solani* strain with a inhibition zone of 4.5 cm (Figure 2A). *Bacillus* showed a slight inhibition and induction of resistance structures development (sclerotia) in the *R. solani* strain (Figure 2B) and invaded and caused mycelium lysis of the Fol strain (Figure 2C). *Trichoderma* carried out its competence and mycoparasite activity on *R. solani* strains (Figure 2D) and Fol. *Alternaria* and *Penicillium* grew faster than Fol and *R. solani*. *Alternaria* showed a 1cm per day radial growth and it invaded all the culture medium, suggesting competitive antagonism to wards these SPP (Figure 2E).

These results suggest that the most abundant microbial populations associated to the DCR, are genera that include species that act as SPP biological control agents (Baker and Cook, 1974). Although in this work *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* species were not determined, it was shown that these isolates are Fol and *R. solani* antagonists and that these are important and diversified plant pathogens in soils of San Luis Potosi (Monreal, 2008). Good *in vitro* antagonistic behavior does not ensure biocontrol under natural conditions but it predicts that this may happen (Alonso *et al.*, 2002).

Trichoderma was not detected in the DCR stored during two and five years; according to Wakelin *et al.* (1999), this fungus is susceptible to desiccation periods longer than one year. In contrast, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* and *Alternaria*, seem to have an excellent ability

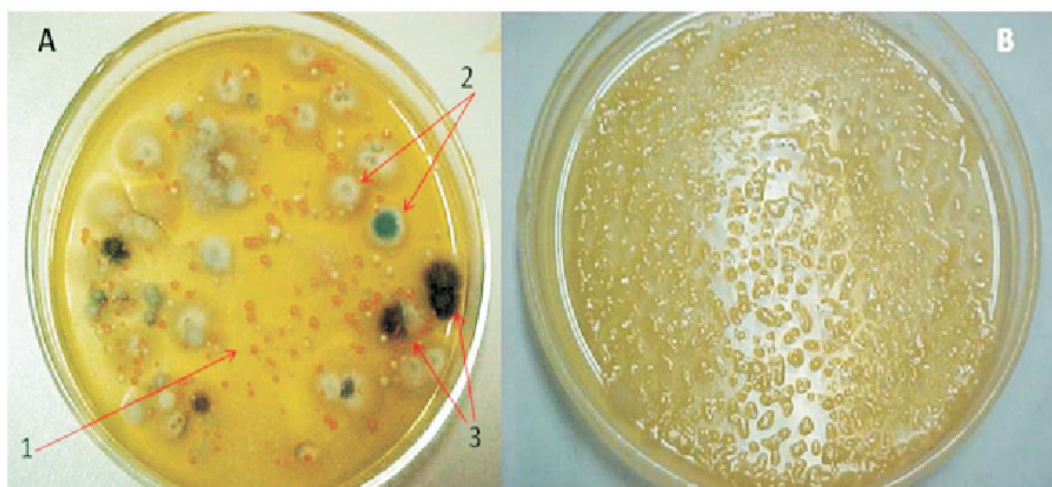


Figura 1. Microflora viable aislada en PDA y YPGA a partir residuos deshidratados de col almacenados durante cinco años. A) Crecimiento en PDA: 1) Colonias amarillo intenso que corresponden a *Pseudomonas*; 2) Colonias con el centro verde-azul y periferia blanca de *Penicillium* y 3) Colonias negras de *Alternaria*. B) Colonias desarrolladas en YPGA, de aspecto mucoso brillantes que corresponden a *Bacillus*.

Figure 1. Isolated viable microflora in PDA and YPGA from dehydrated cabbage residues stored during five years. A) Growth on PDA: 1) Deep yellow colonies corresponding to *Pseudomonas*; 2) Colonies with blue-green center and white borders of *Penicillium* and 3) Black colonies of *Alternaria*. B) Colonies developed in YPGA, bright mucosal aspect corresponding to *Bacillus*.

Pseudomonas mostró antibiosis únicamente contra la cepa de *R. solani*, con un halo de inhibición de 4.5 cm (Figura 2A). *Bacillus* mostró una leve inhibición e inducción del desarrollo de estructuras de resistencia (esclerocios) en la cepa de *R. solani* (Figura 2B) e invadió y causó lisis del micelio de la cepa de Fol (Figura 2C). *Trichoderma* ejerció su actividad de competencia y micoparásito sobre las cepas de *R. solani* (Figura 2D) y Fol. *Alternaria* y *Penicillium* crecieron más rápidamente que Fol y *R. solani*. *Alternaria* tuvo un crecimiento radial de un centímetro por día e invadió todo el medio de cultivo, lo cual sugiere antagonismo por competencia hacia estos FHS (Figura 2E).

Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones microbianas más abundantes asociadas a los RDC, son géneros que incluyen especies que actúan como agentes de control biológico de FHS (Baker y Cook, 1974). Aunque en este trabajo no se determinó la especie de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*, si se evidenció que estos aislamientos son antagonistas de Fol y *R. solani*, que son fitopatógenos importantes y diversificados en los suelos de San Luis Potosí (Monreal, 2008). Un buen comportamiento antagonístico *in vitro* no asegura un control biológico en condiciones naturales pero predice que éste puede acontecer (Alonso *et al.*, 2002).

En los RDC conservados por dos y cinco años no se detectó a *Trichoderma*, según Wakelin *et al.* (1999), este hongo es susceptible a periodos de desecación mayor a un año. En contraste *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* y *Alternaria*, parecen tener una excelente capacidad para mantenerse viables por largo tiempo en condiciones de desecación. La microflora benéfica asociada a los RDC le da un valor adicional a su efecto biodesinfectante.

to remain viable for a long period of time under desiccation conditions. The beneficial microflora associated to DCR gives an additional value to its biodesinfectant effect.

Incorporation of microbial populations by adding cabbage residuo to a sterile soil and their pH effect. After 24 h of incorporating DCR2 to soil, only bacteria developed in all culture media used were detected, unlike bacterial populations associated to DCR2 that did not grow in Czapeck. Their cfu on average were $116 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ soil, higher than the cfu determined for DCR2 ($6 \times 10^4 \text{ cfu g}^{-1}$ DCR), predominating *Bacillus* and *Pseudomonas*, which indicates these were the proper conditions for reproduction. Isolated bacteria from this soil, grew in culture media with acidic pH (5.5 in PDA) to slightly alkaline (7.5 in Czapeck), which shows a superior diversity of bacteria in soil with DCR2 in fermentation. The abundance of bacterial populations on the soil with DCR2, agrees with the results obtained by Calbrix *et al.* (2007) who estimated that the initial decomposition of organic matter, is due to the 80-90 % of the metabolic activity of the bacteria.

In the control soil, the pH variations were minimal, while on the soil with DCR2, the change was noticeable and significantly higher than in the control ($P < 0.05$), increasing its initial value of 7.57 to 8.79 at 12 d, and then it decreased but still being alkaline (Figure 3). The alkaline pH is consistent with the dominance of bacterial populations and fungi absence, in particular *Bacillus* and *Pseudomonas*, which have been described as putrefactive species that are alkaliphilic and that have a tendency to alkalinize their culture media (Insam *et al.*, 2010). It is assumed that pH changes in sterile soil are primarily due to the transformation of the DCR nitrogen compounds by putrefactive bacteria

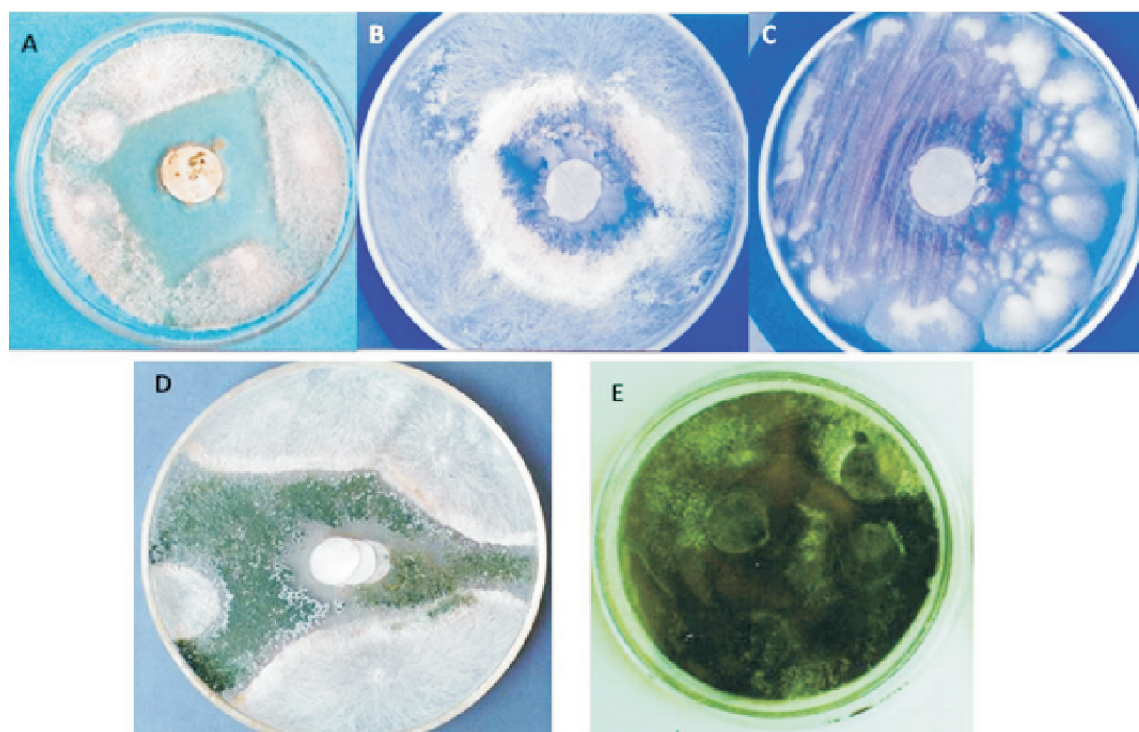


Figura 2. Detección de antagonistas en las poblaciones microbianas predominantes de los residuos deshidratados de col, por pruebas de confrontación *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A) Antibiosis de *Pseudomonas* contra *R. solani*; B) *Bacillus* mostró antibiosis e indujo el desarrollo de esclerocios en *R. solani*; C) *Bacillus* causó lisis del micelio de Fol; D) *Trichoderma* inhibió el crecimiento de *R. solani* por competencia y micoparasitismo; E) *Penicillium* y *Aspergillus* eliminaron a Fol y *R. solani* por competencia (crecimiento rápido).

Figure 2. Detection of antagonists in predominant microbial populations of the dried cabbage residues by confrontation tests *in vitro* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A) *Pseudomonas* antibiosis against *R. solani*. B) *Bacillus* showed antibiosis and induced sclerotia development in *R. solani*; C) *Bacillus* caused lysis of the mycelium of Fol; D) *Trichoderma* inhibited *R. solani* growth by competition and mycoparasitism; E) *Penicillium* and *Aspergillus* eliminated Fol and *R. solani* by competition (fast growth).

Incorporación de poblaciones microbianas por adición de residuos de col a un suelo estéril y su efecto sobre el pH. A las 24 h posteriores a la incorporación de RDC2 al suelo, se detectaron exclusivamente bacterias que se desarrollaron en todos los medios de cultivo utilizados, a diferencia de las poblaciones bacterianas asociadas a los RDC2 que no crecieron en Czapeck. Sus ufc fueron en promedio de 116×10^7 g⁻¹ de suelo, mayores a las ufc determinadas para los RDC2 (6×10^4 ufc g⁻¹ de RDC), y volvieron a predominar *Bacillus* y *Pseudomonas*; lo cual indica que tuvieron condiciones apropiadas para reproducirse. Las bacterias aisladas de este suelo, crecieron en medios de cultivo con pH ácido (5.5 en PDA) a ligeramente alcalino (7.5 en Czapeck), lo que muestra una mayor diversidad de bacterias en el suelo con RDC2 en fermentación. La abundancia de poblaciones bacterianas en el suelo con RDC2, concuerda con los resultados obtenidos por Calbrix *et al.* (2007), que estimaron, que la descomposición inicial de la materia orgánica, se debe al 80-90 % de la actividad metabólica de las bacterias.

En el suelo testigo las variaciones de los valores de pH fueron mínimas, en tanto que en el suelo con RDC2, el

asociado a them, and that in this process there are ammonium or organic bases released, that increase the pH value. Tsao and Oster (1981) and Bello *et al.* (2000) reported that any organic amendment with low C/N ratio (8-20) produce in a short-term (24-72 h) a sharp rise in the pH because of ammonium release. DCR belong to this group, which explains the pH behavior on sterile soil. The alkaline pH itself is adverse for some pathogens, and it may also favor them to be parasitized by certain biocontrol agents as shown by Elad *et al.* (1980) in the interaction *Trichoderma harzianum* with *R. solani* and *S. rolfsii*. Similarly, if ammonia builds up and there are no conditions for its nitrification, then it is transformed into ammonia and nitrous acid, both toxic to SPP but not for some biocontrol agents (Tenuta and Lazarovits, 2002a, 2002b, 2004).

Effect of cabbage residues on pH and microflora in different non-sterile soil types. pH values for the five types of non-sterile soil and with DCR2, showed alternated increase and decrease during the 51 evaluation days. In general, the pH change was similar for all soils, the values fluctuated between 7.33 and 8.24, and they were always significantly ($P = 0.05$) lower than the control, except for

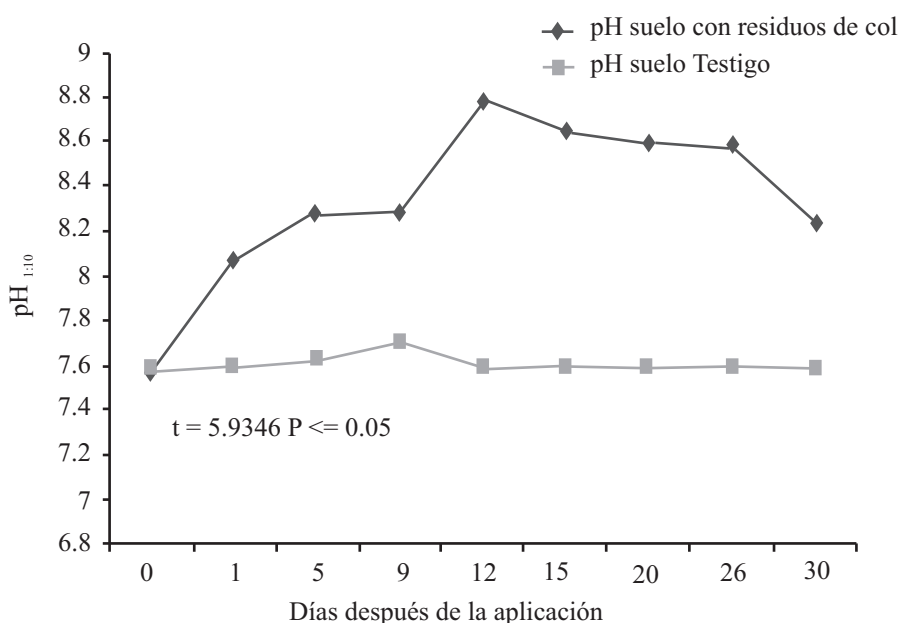


Figura 3. Efecto de los residuos deshidratados de col (RDC) sobre el pH de un suelo estéril. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones.

Figure 3. Effect of dried cabbage residues (DCR) on the pH of a sterile soil. Each dot represents the average of three replications.

cambió fue perceptible y significativamente superior al testigo ($P < 0.05$), incrementando su valor inicial de 7.57 al máximo de 8.79 a los 12 d, y después disminuyó pero sin dejar de ser alcalino (Figura 3). El pH alcalino concuerda con el predominio de poblaciones bacterianas y la ausencia de hongos, en particular de *Bacillus* y *Pseudomonas*, en los que se han descrito especies putrefactivas que son alcalófilas y a su vez tienden a alcalinizar sus medios de cultivo (Insam *et al.*, 2010). Se asume que los cambios de pH en el suelo estéril se deben principalmente a la transformación de los compuestos nitrogenados de los RDC por las bacterias putrefactivas asociadas a éstos, y que en este proceso se liberan bases orgánicas o amoníaco que incrementan el valor del pH. Tsao y Oster (1981), y Bello *et al.* (2000) refieren que cualquier enmienda orgánica con baja proporción C/N (entre 8-20) provocan en un corto plazo (24 a 72 h) un ascenso brusco en el pH, por liberación de amonio. Los RDC pertenecen a este grupo, lo cual explica el comportamiento del pH en el suelo estéril. El pH alcalino en sí, es adverso para algunos fitopatógenos, y además puede favorecer que éstos sean parasitados por ciertos agentes de biocontrol como lo demostraron Elad *et al.* (1980) en la interacción *Trichoderma harzianum* con *R. solani* y *S. rolfsii*. Así mismo si el amonio se acumula y si no existen las condiciones para su nitrificación, éste se transforma en amoníaco y ácido nítrico, ambos son tóxicos para los FHS pero no para algunos agentes de biocontrol (Tenuta y Lazarovits, 2002a, 2002b, 2004).

Efecto de los residuos de col sobre el pH y la microflora en diferentes tipos de suelo sin esterilizar. Los valores de pH para los cinco tipos de suelo sin esterilizar y con RDC2 mostraron incrementos alternados con

Zacatecas 1 (Figure 4). Variation of pH in the five control soils indicates that several chemical and biological reactions occur mainly due to microbial activity, which depends on the microbial species present and it is affected by moisture, temperature, pH, aeration, type and amount of organic matter (Insam *et al.*, 2010). The null pH variation observed in the sterile soil without DCR may be due to the absence of microorganisms (Figure 3). The results shown in Table 2, suggest that the incorporation of DCR2 was one of the factors that indirectly influence the pH variation, and it is very likely that the dynamics of pH variation was mainly due to stimulated microbial activity provided by the cabbage residues and soil characteristics. It is possible that in the soils under study existed different microbial species, however, it can be inferred that the microorganisms of the soil treated with DCR produced some substances that buffered the pH increase and, therefore, this was always lower in comparison to the control, for example, mineralization processes of organic matter by the microbial biomass involves a decrease of the pH of the soil solution due to an increased CO_2 release. Additionally, it is important to consider the influence of organic acids in the soil produced by high populations of *Bacillus* and *Pseudomonas* (Paredes-Mendoza and Espinosa-Victoria, 2010). Only in the Zacatecas 1 soil added with DCR, at the beginning and up to day 12, the pH was higher than the control, however, then it decreased (Figure 4D); nevertheless, the differences were not significant and this could be attributed to microbial species present in this soil that did not release metabolites that affect the pH. The effect of organic amendments on pH is very heterogeneous, for example, Contreras *et al.* (2005) evaluated the addition of chicken manure and cattle vermicompost to two soils with

disminución durante los 51 d de evaluación. En general, la modificación del pH fue similar para todos los suelos, los valores fluctuaron entre 7.33 y 8.24; y siempre fueron significativamente ($P < 0.05$) menores al testigo, a excepción de Zacatecas 1 (Figura 4). La variación del pH en los cinco suelos testigo indica que ocurren muchas reacciones químicas y biológicas debidas principalmente a la actividad microbiana, la cual depende de las especies microbianas presentes y es afectada por la humedad,

contrasting pH, soil (a) pH 6.2 and soil (b) pH 3.4. The manure increased pH from 6.2 to 7.2, and from 3.4 to 4.1, but with vermicompost the soil pH (a) increased from 6.2 to 6.9, and in the soil (b) it decreased from 3.4 to 3.3. Nico *et al.* (2003) reported that the addition of baled alfalfa and fish flour to a soil of pH 6.0, increased the pH values to 7.6 and 8.2, respectively; whereas with mushroom compost the pH was maintained at 6.0. In the research studies mentioned above, the pH was recorded at the beginning and at the end

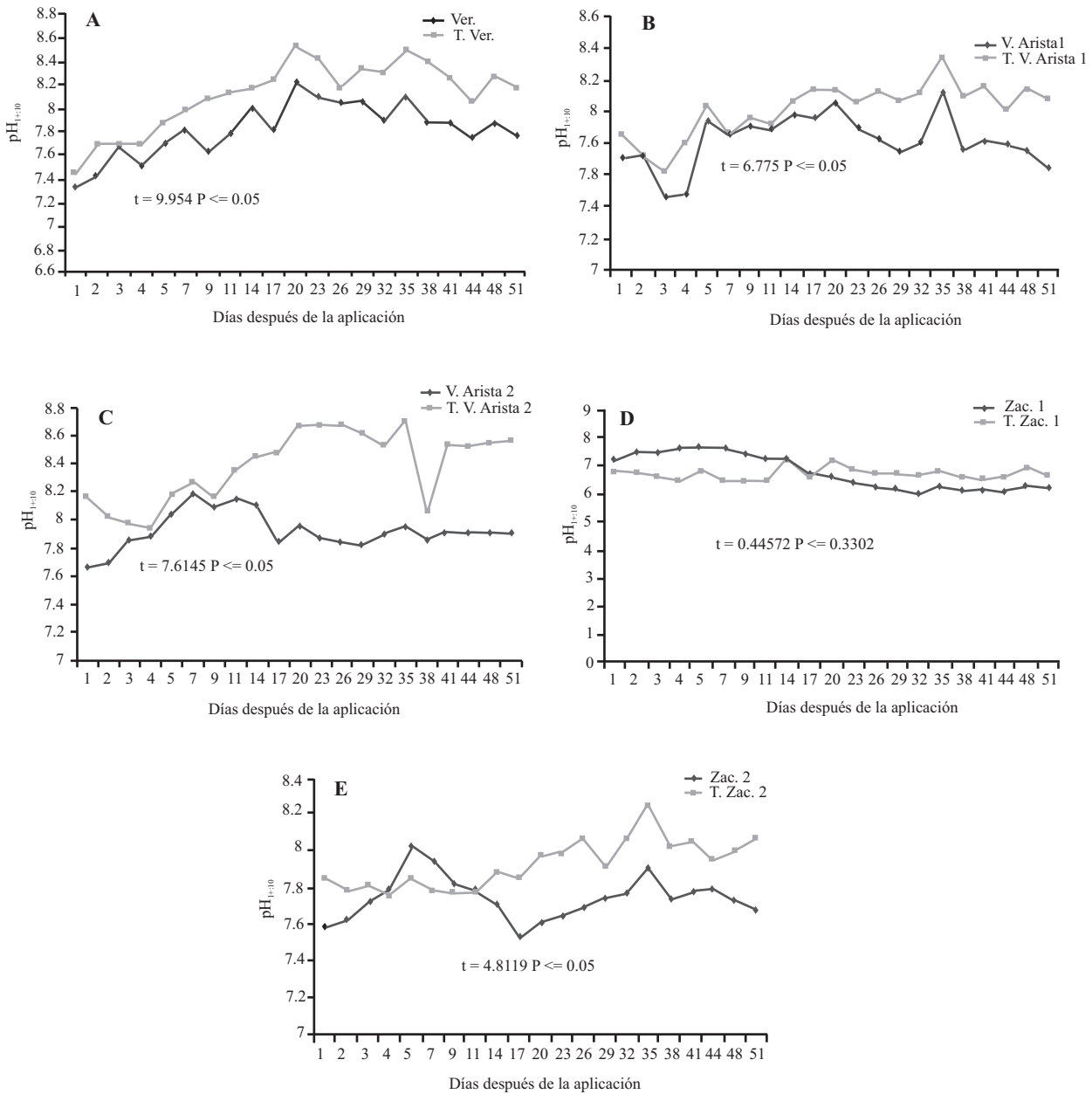


Figura 4. Dinámica del pH por incorporación de residuos deshidratados de col (RDC) en cinco suelos sin esterilizar, procedentes de tres estados de México, durante un período de 51 d. A) Veracruz, B) Villa de Arista 1-San Luis Potosí, C) Villa de Arista 2-San Luis Potosi, D) Zacatecas 1, E) Zacatecas 2.

Figure 4. pH dynamics by incorporation of dried cabbage residues (DCR) in five non-sterile soils from three states of Mexico, during a period of 51 d. A) Veracruz, B) Villa de Arista 1-San Luis Potosí, C) Villa de Arista 2-San Luis Potosi, D) Zacatecas 1, E) Zacatecas 2.

temperatura, pH, aireación, tipo y cantidad de materia orgánica (Insam *et al.*, 2010). La nula variación de pH observada en el suelo estéril sin RDC se puede deber a la ausencia de microorganismos (Figura 3). Los resultados mostrados en el Cuadro 2, sugieren que la incorporación de RDC2 fue uno de los factores que más influyó indirectamente en la variación del pH, y es muy factible que la dinámica de variación del pH se debió principalmente a la actividad microbiana estimulada y aportada por los residuos de col y por las características del suelo. Es posible que en

of the treatment, where as in the present work the pH was measured at different times and it was found that changes were not constant. The heterogeneous effect of organic amendments on soil pH was confirmed by Tenuta and Lazarovits (2002b), who found inconsistencies in the results obtained after the application of nitrogen-rich organic amendments in different soils, concluding that factors influencing pH are organic components of the amendment and the soil characteristics such as cation exchange capacity, the content of organic matter, moisture and bulk density. In

Cuadro 2. Efecto de los residuos deshidratados de col sobre características químicas de cinco suelos procedentes de tres estados de México.

Table 2. Effect of dried cabbage residues on chemical characteristics of five soils from three states of Mexico.

Localidad	pH en H ₂ O		pH en KCl		pH dil 1:10		C. E. dil 1:10		N asim ppm		P asim ppm		K asim ppm		% MO	
	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR
Veracruz	7.84	7.76	7.02	7.02	8.24	7.89	0.25	0.45	41.46	40.24	53.86	52.69	627.2	940.8	1.87	3.73
V. Arista 1	7.86	7.64	7.11	7.05	8.18	7.87	0.32	0.35	65.85	68.29	18.9	57.3	1344	1545	1.09	2.9
V. Arista 2	8.15	7.91	7.43	7.38	8.49	7.97	0.15	0.58	39.02	93.9	17.72	20.76	1187.2	1433.6	2.82	1.8
Zacatecas 1	6.79	6.2	5.69	5.62	7.27	6.77	0.15	0.73	39.024	136.58	16.06	19.23	560	940.8	2.96	2.96
Zacatecas 2	7.85	7.67	7.25	7.24	7.9	7.01	0.12	0.62	34.14	119.51	28.58	26.72	672	1008	2.185	4.32
Promedio	7.698	7.436	6.900	6.862	8.016	7.502	0.198	0.546	43.899	91.704	27.024	35.340	878.080	1173.640	-1.57	3.142
t calculado	3.029		2.728		5.015		-3.42		-2.311		-1.095		-9.213		2.365	
T crítico	2.776		2.776		2.776		2.78		2.776		2.776		2.776		0.161	
P(T ≤ t)	0.039		0.053		0.007		0.026		0.082		0.335		0.0007			

Las diferencias estadísticas se establecieron con la prueba t de Student.

t: estadístico t de Student calculado

T: estadístico t de Student crítico

P: probabilidad de la prueba de t de Student

Cada cifra representa el promedio de tres repeticiones.

SR: suelo sin residuos deshidratados de col

CR: suelo con residuos deshidratados de col

V. Arista 1 y V. Arista 2 son suelos de San Luis Potosí

los suelos en estudio existan especies microbianas diferentes, sin embargo, se puede inferir que en general los microorganismos de los suelos tratados con RDC produjeron algunas sustancias que amortiguaron el incremento de pH y por ello, este siempre fue más bajo con relación al testigo, por ejemplo, los procesos de mineralización de la materia orgánica por la mayor biomasa microbiana implica una disminución del pH de la solución del suelo por una mayor liberación de CO₂. A esto habrá que sumar también la influencia de ácidos orgánicos en el suelo producidos por las altas poblaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas* (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Solamente en el suelo Zacatecas 1 adicionado con RDC, al inicio y hasta el día 12, el pH fue mayor al del

soils with DCR also increased the available nitrogen content (P = 0.082) and available potassium (P = 0.0007). The first increased markedly in the soils: Villa de Arista 2 (140.64 %) and Zacatecas 1 and 2 (250 %), and consequently there was a significant increase (P = 0.026) in the electric conductivity (Table 2). Potassium significantly increased in most soils, especially in Zacatecas 1 (68 %) and 2 (50 %). Phosphorus increased in lower ratio in three of the soils under study without observing significant differences (P = 0.335) between controls and the ones with DCR application. In general, DCR provided nitrogen and potassium (Table 2); Morra and Johnson-Maynard (2003) cited by Brown and Morra (2005) indicated that the cruciferous tissues are a source of available nitrogen. On the other hand, Escandon

testigo, no obstante, después disminuyó (Figura 4D); sin embargo, las diferencias no fueron significativas y esto se podría atribuir a que las especies microbianas de este suelo no liberan metabolitos que incidan sobre el pH. El efecto de las enmiendas orgánicas sobre el pH es muy heterogéneo, por ejemplo Contreras *et al.* (2005), evaluaron la adición de gallinaza y vermicomposta de ganado bovino a dos suelos con pH contrastantes, suelo (a) pH 6.2 y suelo (b) pH 3.4. La gallinaza aumentó el pH de 6.2 a 7.2, y de 3.4 a 4.1, pero con vermicomposta el pH del suelo (a) se incrementó de 6.2 a 6.9, y en el suelo (b) disminuyó de 3.4 a 3.3. Nico *et al.* (2003) determinaron que la incorporación de alfalfa enfiada y harina de pescado a un suelo con pH de 6.0, incrementó los valores a pH 7.6 y 8.2 respectivamente; en cambio con composta de champiñón se mantuvo el pH en 6.0. En las investigaciones citadas, el pH se registró al inicio y al final del tratamiento, mientras que en el presente trabajo el pH se midió a diferentes tiempos y se encontró que los cambios no son constantes. El efecto heterogéneo de las enmiendas orgánicas sobre el pH del suelo fue corroborado por Tenuta y Lazarovits (2002b), que observaron inconsistencias en los resultados obtenidos tras la aplicación de enmiendas orgánicas ricas en nitrógeno en diferentes suelos, llegando a la conclusión de que los factores que influyen en el pH son los componentes orgánicos de la enmienda y las características del suelo como la capacidad de intercambio catiónico, el contenido de materia orgánica, la humedad y la densidad aparente. En los suelos con RDC también se incrementó el contenido de nitrógeno asimilable ($P = 0.082$) y potasio asimilable ($P = 0.0007$). El primero aumentó notablemente en los suelos de Villa de Arista 2 (140.64 %) y Zacatecas 1 y 2 (250 %), y en consecuencia hubo un incremento significativo ($P = 0.026$) en la conductividad eléctrica (Cuadro 2). El potasio aumentó considerablemente en la mayoría de los suelos, especialmente en Zacatecas 1 (68 %) y 2 (50 %). El fósforo se incrementó en menor proporción en tres de los suelos estudiados, no observándose diferencia significativa ($P = 0.335$) entre testigos y la aplicación de RDC. En general, los RDC aportaron nitrógeno y potasio (Cuadro 2), Morra y Johnson-Maynard (2003) citados por Brown y Morra (2005) indican que los tejidos de crucíferas son fuente de nitrógeno asimilable. Por su parte Escandón (2007), obtuvo plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* con excelente porte, cantidad de follaje y color, cuando fueron cultivadas en sustrato adicionado con RDC.

El análisis microbiológico de los cinco suelos con RDC2 reveló que no hubo crecimiento de microorganismos en las placas de PDA acidulado, ni antes ni después de la adición de los RDC, esto sugiere que la microflora de dichos suelos no es tolerante al pH ácido de 3.5. En el Cuadro 3 se presentan las poblaciones microbianas cultivables en PDA no acidulado (pH 5.5) y en YPGA (pH 7.1). Se aprecia que la microflora natural en todos los suelos está constituida principalmente por bacterias, solamente en el suelo Veracruz se aislaron hongos en YPGA y en el de Villa de Arista 2 en PDA, pero con poblaciones menores a la de las bacterias. En todos los suelos tratados con RDC, las ufc de hongos y bacterias g^{-1} de suelo fueron mayores con respecto

(2007), obtuvo *Kalanchoe blossfeldiana* plantas with excellent size, amount of foliage and color, when they were grown in substrate supplemented with DCR.

Microbiological analysis of the five soils with DCR2 showed no microorganisms growth in acidulated PDA plates, before or after addition of the DCRs, suggesting that microflora in such soils is not tolerant to acidic pH (3.5). Table 3 shows the cultivable microbial populations in non-acidified PDA (pH 5.5) and in YPGA (pH 7.1). It can be observed that the natural microflora in all soils is mainly composed by bacteria, except in the Veracruz soil where fungi were isolated in YPGA and in Villa de Arista 2 in PDA, but with smaller populations than bacteria. In all soils treated with DCR, the cfu of fungus and bacteria g^{-1} soil were higher than the control; and the increase of bacterial populations was significantly high for both acidophilic ($P < 0.01$) and for neutrophils ($P < 0.01$) (Table 3). This coincides with Castro *et al.* (1999) report, that after 25 d of adding 1 % DCR to a soil, they registered bacteria increase from 13.8×10^6 to 41×10^6 cfu, and for fungi from 7.5×10^4 to 16.8×10^4 cfu. Ramírez-Villapudua and Munnecke (1987, 1988) reported that the bacterial population increased 16 times in soils treated with 1 % DCR, and Cohen *et al.* (2005) found increments of two logarithmic units in bacterial populations in two weeks after the addition of residues of *Brassica napus*, with predominance of *Streptomyces* sp. The DCR incorporated, also contributed with fungi to those soils where they were not detected at the beginning of the experiment, and in those that were present, the populations increased, particularly *Penicillium*. Again *Bacillus* and *Pseudomonas* predominated, which were not observed in the controls. On the other hand, fungi isolated in three of the soils lacking of them before treatment with DCR, corresponded to *Penicillium* and *Aspergillus*, these same genders have been isolated by Castro *et al.* (1999) in soils treated with DCR. The prevalence of bacterial species in soils with and without DCR is related to the dynamics of pH in both soils, as it favored bacterial populations and a few fungi populations. Also in soils with added organic amendments, organic matter content is higher and it induces an increase in microbial activity, which results in higher biomass, but depending on the amendment it may increase or decrease the species diversity, so that some amendments can define preferential development of species more adapted to the nutritional source consumption (Kwasna *et al.*, 2000). Therefore, based on this discussion, it can be deduced that with cabbage residues not only microflora increases in soils, but also new bacterial and fungal populations are incorporated or induced which can be antagonists, and hyperparasitism is favored (Villar *et al.*, 1990); hence, in an indirect way, organic amendments have also been used for biological control of SPP (Bello *et al.*, 2000; Osorio *et al.*, 2005). In a first stage, when applying DCR to the soil, different isothiocyanates are provided mainly for a natural chemical treatment of the pathogens, and these can also be affected by changes in pH, then antagonistic microbiota reduces reinfections (Castro *et al.*, 1999), and lastly N and K are provided for an improved plant growth. Díez-Rojo *et al.* (2010) reported that the DCR and

Cuadro 3. Efecto de los residuos deshidratados de col sobre la población de bacterias y hongos cultivables, en cinco suelos procedentes de tres estados de México.

Table 3. Effect of dried cabbage residues on the populations of cultivable bacteria and fungi in five soils from three states of Mexico.

Suelo	Microflora inicial PDA - ufc g ⁻¹	Microflora final PDA - ufc g ⁻¹	Microflora inicial YPGA - ufc g ⁻¹	Microflora final YPGA - ufc g ⁻¹
Veracruz	B: 150 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸	B: 76 x 10 ⁶ H: 1 x 10 ⁴	B: 36 x 10 ⁸ H: 1 x 10 ⁶
V. Arista 1	B: 6 x 10 ⁶	B: 25 x 10 ⁸ H: 3 x 10 ⁴	B: 30x 10 ⁵	B: 30 x 10 ⁸ H: 1 x 10 ⁴
V. Arista 2	B: 6 x 10 ⁶ H: 7 x 10 ⁵	B: 36 x 10 ⁸ H: 10 x 10 ⁶	B: 20 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸ H: 2 x 10 ⁴
Zacatecas 1	B: 100 x 10 ⁶	B: 35 x 10 ⁸ H: 23 x 10 ⁶	B: 100 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸
Zacatecas 2	B: 150 x 10 ⁶	B: 32 x 10 ⁸ H: 7 x 10 ⁴	B: 12 x 10 ⁶	B: 28 x 10 ⁸ H: 6 x 10 ⁴
Promedio t calculado T crítico	B: 8.24 x 10 ⁷ -157488123 2.77644511	B: 3.16 x 10 ⁹	B: 4.22 x 10 ⁷ -23.9120956 2.77644511	B: 3.08 x 10 ⁹
P (T ≤ t)	9.4968 x 10 ⁻⁵		1.814 x 10 ⁻⁵	

Las diferencias estadísticas para las poblaciones bacterianas se establecieron con la prueba t de Student.

t: estadístico t de Student calculado

T: estadístico t de Student crítico

P: probabilidad de la prueba t de Student

Cada cifra representa el promedio de tres repeticiones.

B: Bacterias

H: Hongos

V. Arista 1 y V. Arista 2 son suelos de San Luis Potosí

al testigo; y el incremento de las poblaciones bacterianas fue altamente significativo tanto para las acidófilas ($P < 0.01$) como para las neutrófilas ($P < 0.01$) (Cuadro 3). Esto coincide con los resultados de Castro *et al.* (1999), que después de 25 d de haber adicionado RDC al 1% a un suelo, determinaron incrementos de 13.8×10^6 a 41×10^6 ufc de bacterias, y de 7.5×10^4 a 16.8×10^4 ufc de hongos. Ramírez-Villapudua y Munnecke (1987, 1988) reportan que la población bacteriana se incrementó 16 veces en suelos tratados con RDC al 1%, y Cohen *et al.* (2005) encontraron incrementos de dos unidades logarítmicas en las poblaciones de bacterias en dos semanas posteriores a la adición de residuos de *Brassica napus*, con predominio de *Streptomyces* sp. Los RDC incorporados, además aportaron hongos en aquellos suelos donde éstos no fueron detectados al inicio del experimento, y en los que estuvieron presentes, se incrementaron las poblaciones, en particular de *Penicillium*. Nuevamente predominaron los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales no se registraron en los testigos. Por otro lado, los hongos que se aislaron en tres de

other agro-industrial residues are an alternative to replace chemical fumigants, in particular methyl bromide that favors the destruction of the ozone layer and it is an environmental toxic pollutant. Some studies show that with the biodisinfection and biological control of the SPP with DCR and other organic amendments, the crop profitability is higher, because expenses are reduced in cost and application of synthetic fungicides, besides they do not affect health workers in the field (Castro *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2008)

CONCLUSIONS

The microflora associated to dehydrated cabbage residues consisted primarily of *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp.

Bacillus, *Pseudomonas*, *Penicillium* and *Alternaria* remained viable in dehydrated cabbage residues during five years if stored in a dry environment.

Dehydrated cabbage residues favored, and increased in soils, the microbial populations constituted mainly of

los suelos carentes de ellos antes del tratamiento con RDC, correspondieron a *Penicillium* y *Aspergillus*, estos mismos géneros fueron aislados por Castro *et al.* (1999), en suelos tratados con RDC. El predominio de especies bacterianas en los suelos con y sin RDC, tiene relación con la dinámica del pH en ambos suelos, éste favoreció a las poblaciones de bacterias y a unas cuantas de hongos. Asimismo en los suelos adicionados con enmiendas orgánicas, el contenido de materia orgánica es mayor y ésta induce un incremento en la actividad microbiana, la cual se traduce en una mayor biomasa, pero dependiendo de la enmienda se puede aumentar o disminuir la diversidad de especies, de tal forma que algunas enmiendas pueden definir el desarrollo preferencial de aquellas especies más adaptadas al consumo de la fuente nutricional (Kwasna *et al.*, 2000). Por lo anterior se deduce que con los residuos de col no solo se incrementa la microflora en los suelos, sino que también se incorporan o se inducen nuevas poblaciones fúngicas y bacterianas que pueden ser antagonistas, y se favorece el hiperparasitismo (Villar *et al.*, 1990); por ello de manera indirecta las enmiendas orgánicas también se han utilizado para el control biológico de FHS (Bello *et al.*, 2000; Osorio *et al.*, 2005). Al aplicar RDC al suelo, en una primera fase se aportan principalmente diversos isotiocianatos para un tratamiento químico natural de los fitopatógenos, además éstos también pueden ser afectados por las variaciones de pH que se producen, posteriormente la microbiota antagonista reduce las reinfecciones (Castro *et al.*, 1999), y finalmente se proporciona N y K para un mejor crecimiento de las plantas. Díez-Rojo *et al.* (2010), señalan que los RDC y otros residuos agroindustriales son una alternativa para sustituir a los fumigantes químicos, en particular al bromuro de metilo que favorece la destrucción de la capa de ozono y es un contaminante tóxico ambiental. Algunos estudios muestran que con la biodesinfección y control biológico de los FHS con RDC y otras enmiendas orgánicas, la rentabilidad de los cultivos es mayor, debido a que se reducen gastos en el costo y aplicación de los fungicidas sintéticos, y además no se afecta la salud de los trabajadores del campo (Castro *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La microflora asociada a los residuos deshidratados de col estuvo constituida principalmente por *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.* y *Rhizopus sp.*

Bacillus, *Pseudomonas*, *Penicillium* y *Alternaria* permanecieron viables en los residuos deshidratados de col por cinco años, conservados en un ambiente seco.

Los residuos deshidratados de col favorecieron e incrementaron en los suelos, poblaciones microbianas constituida principalmente por *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*

Los residuos deshidratados de col adicionados a un suelo estéril aumentaron significativamente el pH de 7.57 a 8.79; sin embargo en cuatro de cinco suelos sin esterilizar, con su microflora nativa, promovieron la variación dinámica del pH, con valores significativamente menores a los de los testigos y fluctuaron entre 7.33 y 8.24; además

Bacillus sp., *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.* and *Aspergillus sp.*

Dehydrated cabbage residues added to a sterile soil significantly increased pH from 7.57 to 8.79; however, in four out of five non-sterile soils with their native microflora, promoted dynamic variation of pH, with values significantly lower than the controls and they oscillated between 7.33 and 8.24; additionally, they increased nitrogen and potassium content.

Acknowledgements. This article is published thanks to the financial resources of the PIFI 2012 program of the UASLP.

LITERATURACITADA.

- Alexopoulos C, Mims C and Blackwell M. 1996. Introductory Micology. Fourth Edition. John Wiley and Sons. New York, U.S. 869p.
- Alonso RR, Barranco MB, Gracia RG y Jiménez MG. 2002. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66:45-48.
- Atlas R y Barttha L. 2005. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 677p.
- Baker KF and Cook RJ. 1974. Biological Control of Pathogens. W.H. Fremman Company. San Francisco, U.S. 433p.
- Barnett H and Hunter B. 1972. Illustred Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minnesota, U.S. 241p.
- Barer MR and Harwood CR. 1999. Bacterial viability and culturability. Advances in Microbial Physiology 41:93-137.
- Bello A, López-Pérez JA, Díez-Rojo MA, López-Cepero J, García-Álvarez A. 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura 729:19-29.
- Bello A, López-Pérez JA, Sanz R, Escuer M and Herrero J. 2000. Biofumigation and organic amendments. Pp 113-141. In: United Nations Environment Programme (eds). Methyl Bromide Alternatives for North Africa and Southern European Countries. UNEP, French. 244p.
- Brown J and Morra MJ. 2005. Glucosinolate-Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pest. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy. 99p.
- Brown PD and Morra MJ. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. Advances in Agronomy 61:167-231.
- Brown PD, Morra MJ, McCaffrey JP, Auld DL and Williams L III. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. Journal of Chemical Ecology 17:2021-2034.
- Calbrix R, Barray S, Chabrierie O, Fourrie L and Laval K. 2007. Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. Applied Soil Ecology 35:511-522.
- Castro RR, Herrera IL, Suárez CN, Perera AT y Mesa JT.

incrementaron el contenido de nitrógeno y potasio.

Agradecimientos. Este artículo se publica gracias a los recursos financieros del programa PIFI 2012 de la UASLP.

1999. Efecto de los residuos de col seca (*Brassica oleracea* L.) con cobertor plástico transparente sobre la supervivencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola* 3:5-11.
- Coelho L, Chellemi DO and Mitchell DJ. 1999. Efficacy of solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. in North Florida. *Plant Disease* 83:293-299.
- Cohen MF, Yamasaki H and Mazzola M. 2005. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1215-1227.
- Contreras BF, Paolini J y Rivero C. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la actividad de las enzimas fosfomonoesterasa ácida y arilsulfatasa en suelos del municipio Rivas Dávila (estado Mérida). *Revista Facultad de Agronomía (Maracay)* 31:53-66.
- Cook R and Baker KF. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S. 539p.
- Cowan ST, Steel KJ, Barrow GI and Feltham RK. 1993. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Third Edition. Cambridge University Press. New York, U. S. 331p.
- Díez-Rojo MA, López-Pérez JA, Urbano-Terrón P y Bello A. 2010. *Biodesinfección de Suelos y Manejo Agronómico*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 407p.
- Elad Y, Chet I and Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:119-121.
- Escandón M A. 2007. Diagnóstico y manejo biológico de patógenos radicales asociados a la especie ornamental *Kallanchoe blossfeldiana* Poelln. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía.
- Escobar EN, Mora DJ y Romero JNJ. 2012. Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. *Boletín Científico Museos de Historia Natural* 16:75-88.
- Gamliel A and Stapleton JJ. 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83:899-905.
- Gardiner JB, Morra MJ, Eberlein CV, Brown PD and Borek V. 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3837-3842.
- Gimsing AL and Kirkegaard JA. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2255-2264.
- Guédez C, Cañizalez LM, Castillo C y Olivar R. 2009. Microflora asociada a dos sustratos orgánicos y su efecto en el control de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomía Colombiana* 27:395-399.
- Hoitink HAJ and Boehm MJ. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-depend phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37:427-446.
- Insam H, Franke-Whittle I and Goberna M. 2010. *Microbes at Work from Wastes to Resources*. Springer. Heidelberg, Germany. 350p.
- Kirkegaard JA and Sarwar M. 1998. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in plant glucosinolate profiles of diverse field grown brassicas. *Plant and Soil* 201:71-89.
- Kwasna H, Sierota Z and Bateman GL. 2000. Fungal communities in fallow soil before and after amending with pine sawdust. *Applied Soil Ecology* 14:177-182.
- Lazarovits G, Conn KL, Abbasi PA and Tenuta M. 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. *Acta Horticulturae* 689:215-224.
- Lazzeri L, Leoni O and Manici LM. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products* 20:59-65.
- Matthiessen JN and Shackleton MA. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science* 61:1043-1051.
- Mayton HS, Oliver C, Vaughn SF and Loria R. 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- Mojtahedi H, Santo GS, Hang AN and Wilson JH. 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. *Journal of Nematology* 23:170-174.
- Monreal V CT. 2008. Diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en jitomate y chile mediante técnicas moleculares. *Claridades Agropecuarias* 173:26-34.
- Morra MJ and Kirkegaard JA. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1683-1690.
- Motisi N, Montfort F, Doré T, Romillac N and Lucas P. 2009. Duration of control of two soilborne pathogens following incorporation of above- and below-ground residues of *Brassica juncea* into soil. *Plant Pathology* 58:470-478.
- Muehlchen AM, Rand RE and Parke JL. 1990. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root-rot of peas. *Plant Disease* 74:651-654.
- Nico AI, Mónaco CI, Dal Bello G y Alippi H. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II. Microflora asociada y antagonismo in vitro de los

- aislados más frecuentes. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 34:29-44.
- Nico AI, Mónaco CI, Dal Bello G y Alippi H. 2003. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: test de patogenicidad y actividad biológica de metabolitos volátiles y difusibles. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 32:173-192.
- Njoroge SMC, Riley MB and Keinath AP. 2008. Effect of incorporation of *Brassica* spp. residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping-off and *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Disease* 92:287-294.
- Oliver JD. 2005. The viable but non culturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43:93-100.
- Osorio-Nila MA, Vázquez-García LM, Salgado-Siclán ML y González-Esquivel CE. 2005. Efecto de dos enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:203-208.
- Paredes-Mendoza M y Espinosa-Victoria D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28:61-70.
- Ramírez-Villapadua J and Munnecke DE. 1988. Effect of solar heating and soil amendment of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and other organisms. *Phytopathology* 78:289-295.
- Ramírez-Villapadua J and Munnecke DE. 1987. Control of cabbage yellow (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) by solar heating of field soil amended with dry cabbage residues. *Plant Disease* 71:217-221.
- Reeuwijk LP van. 2002. Procedure for Soil Analysis. 6th Edition. International Soil Reference and Information Centre/FAO. Wageningen, The Netherlands 40p.
- Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR and Brown PD. 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal to wards *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* 87:77-82.
- Snapp SS, Date KU, Kirk W, O'Neil K, Kremen A and Bird G. 2007. Root, shoot tissues of *Brassica juncea* and Cereal secale promote potato health. *Plant and Soil* 294:55-72.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2004. Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Applied Soil Ecology* 25:219-236.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2002a. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92:255-264.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2002b. Identification of specific soil properties that affect the accumulation and toxicity of ammonia to *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:219-229.
- Tsao PH and Oster JJ. 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soil amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathology* 71:53-59.
- Villar LRC, Zavaleta-Mejía F y García ER. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (*Brassicaceae*) sobre fitopatógenos del suelo, II. Efecto de la incorporación de col y brocoli sobre la pudrición blanda (*Sclerotium cepivorum* Berk) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:160-169.
- Wakelin SA, Sivasithamparam K, Cole ALJ and Skipp RA. 1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42:37-45.
- Zasada IA, Ferris H, Elmore CL, Roncoroni JA, MacDonald JD, Bolkran LR and Yakabe LE. 2003. Field application of brassicaceous amendments for control of soilborne pests and pathogens. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2003-1120-01-RS.

La Biosíntesis de las Poliaminas en el Hongo Fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*

Polyamine Biosynthesis in the Phytopathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina*

Martha Viviana Roa Cordero y Raymundo Rosas Quijano, Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, México. Correspondencia: viviana.udes@gmail.com

(Recibido: Diciembre 12, 2012 Aceptado: Abril 08, 2013)

Roa Cordero MV y Rosas Quijano R. 2013. La Biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Revista Mexicana de Fitopatología 31:45-59.

Resumen. El estudio del mecanismo biosintético de las poliaminas en los hongos fitopatógenos permite precisar las particularidades metabólicas de este proceso biológico, que pese a su conservación evolutiva, facilita la comprensión del papel que desempeñan estos compuestos en el proceso patogénico. *Macrophomina phaseolina* es un hongo fitopatógeno con un amplio espectro de hospedantes que incluye diferentes especies de granos de interés agroeconómico, tales como legumbres y vegetales. Debido a su potencial necrotrófico, elevada persistencia y distribución geográfica globalizada, la comprensión del papel regulador que ejercen las poliaminas en la virulencia de este microorganismo, constituye un eslabón fundamental para el entendimiento del patosistema planta-*M. phaseolina*. Mientras se progresa en la descripción de la ruta biosintética de las poliaminas en este fitopatógeno, nosotros discutimos un modelo sobre la síntesis de estos compuestos y su función en la patogénesis, basados en la evidencia de su genoma, recientemente secuenciado.

Palabras clave adicionales: Ornitina, putrescina, espermidina, espermina, pudrición carbonosa, antienzima.

Las características generales de los organismos obedecen al binomio herencia-ambiente, lo que establece una estrecha relación entre los rasgos genéticos de los individuos y sus respuestas a las diferentes condiciones del entorno. Esto podría explicar la evolución de sistemas de regulación complejos que permiten la adaptación celular y reflejan la interacción hospedero-patógeno.

Las poliaminas son policationes alifáticas de origen orgánico, que gracias a su versatilidad y ubicuidad participan en la regulación de procesos moleculares y

Abstract. The study of polyamine biosynthetic mechanisms in phytopathogenic fungi is relevant in order to clarify the metabolic variations of this biological process, which despite its evolutionary conservation, could help to understand the role of these compounds in the fungal pathogenic process. *Macrophomina phaseolina* is a fungal plant pathogen with wide host spectrum including economically important crops such as legumes and vegetables. Due to its necrotrophic potential, high persistence and global distribution, the comprehension of the regulatory role played by polyamines in fungal virulence is a key factor to understand the pathosystem plant-*M. phaseolina*. Since polyamine metabolism in *M. phaseolina* is not yet completely understood, we discuss a model to explain the polyamine biosynthetic pathways and their role in the pathogenesis, based on their recently sequenced genome.

Additional keywords: Ornithine, putrescine, spermidine, spermine, charcoal rot, antizyme.

The main characteristics of the organisms are due to the inheritance-environment duo, which establishes a close relationship between genetic traits of individuals and their responses to different environmental conditions. In turn, this could explain the evolutionary process of complex regulatory systems that allow cell adaptation and reflects the host-pathogen interaction.

Polyamines are organic aliphatic polycations, which due to their versatility and ubiquity are involved in the regulation of several cellular and molecular processes. They are nitrogenous compounds largely bound to proteins, nucleic acids and cell membranes due to their positive charge, distributed along the molecule. Previous reports have described a role of polyamines as osmolytes, due to their high cytoplasmic concentrations (Rajam *et al.*, 2004). Putrescine (diamine), spermidine (triamine) and spermine (tetramine) are the most abundant polyamines in

celulares. Se trata de compuestos nitrogenados cuya carga positiva, distribuida a lo largo de la molécula, los capacita para establecer asociaciones con proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Se ha descrito además que, dada su alta concentración en el citoplasma, pueden comportarse como osmolitos (Rajam *et al.*, 2004). La diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetramina espermina son las poliaminas más abundantes en las células vivas (Groopa y Benavides, 2008); no obstante, pese a que la espermina se encuentra en la mayoría de eucariotas superiores, un gran número de especies fúngicas no la sintetizan (Morgan, 1998; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

El estudio de las poliaminas en diferentes modelos (mamíferos, parásitos protozoarios, hongos, plantas, etc.) ha permitido dilucidar su papel como reguladores de una amplia gama de procesos biológicos relacionados con el crecimiento, desarrollo y la diferenciación celular, entre otros (Coburn, 2009; Igarashia and Kashiwagic, 2010; Iacomino *et al.*, 2012). Inicialmente se les atribuyó este papel únicamente sobre la base de evidencia circunstancial, que reveló un incremento en la concentración de poliaminas en tejidos altamente proliferativos, así como también un aumento precipitado de la actividad enzimática mediadora de su biosíntesis, cuando el crecimiento o la diferenciación celular fueron inducidos (Heby, 1981; Tabor y Tabor, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 1988; Desforges *et al.*, 2013). Investigaciones posteriores confirmaron su papel como reguladores de la embriogénesis somática, desarrollo de flores y frutos, respuesta al estrés biótico y abiótico, senescencia, formación de la raíz y brotes en vegetales (Rajam *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2011; Tisi *et al.*, 2011); la función de las poliaminas en células de mamíferos resulta mucho más compleja, ya que participan en la regulación de diversas actividades celulares a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, afectando procesos de proliferación, transformación, diferenciación y de apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008). Así mismo, se ha establecido que las poliaminas regulan de cierto modo la virulencia de los hongos fitopatógenos, dada la estrecha relación que existe entre su metabolismo y fenómenos biológicos como el dimorfismo, la germinación de esporas, la formación de apresorio y la conidiación (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Khurana *et al.*, 1996; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

A pesar de las particularidades funcionales y del metabolismo de las poliaminas en las células eucariotas y procariotas, su papel en la regulación de diferentes procesos biológicos está determinado principalmente por su naturaleza catiónica, que les permite interactuar con los ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana y algunos componentes de la pared celular. Como consecuencia de estas interacciones, las poliaminas estabilizan la estructura de las macromoléculas polianiónicas, afectan la expresión de los genes y de diversas enzimas (incluidas cinasas y fosfatasa), influyen selectivamente en la traducción de algunos mRNA, regulan interacciones DNA-proteína y el proceso de apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Pegg, 2009; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid, el agente

living cells (Groopa and Benavides, 2008); however, although spermine is produced by higher eukaryotes, a large number of fungal species are incapable of its synthesis (Morgan, 1998; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

The study of polyamines in different models (e.g. mammal cells, protozoans, fungi and plants, among others) has allowed the elucidation of their role in the regulation of a wide range of biological processes related to cell growth, development and differentiation (Coburn, 2009; Igarashia and Kashiwagic, 2010; Iacomino *et al.*, 2012). Early studies suggested their regulatory role based only on circumstantial evidence, which showed an increase in polyamine concentration in highly proliferative tissues, as well as an abrupt increase in enzymatic activity that mediated their biosynthesis, when growth or cellular differentiation were induced (Heby, 1981; Tabor and Tabor, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 1988; Desforges *et al.*, 2013). Subsequent reports confirmed their role as regulators of somatic embryogenesis, flower and fruits development, response to biotic and abiotic stress, senescence, root and shoot formation in vegetables (Rajam *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2011; Tisi *et al.*, 2011). The role of polyamines in mammalian cells is far more complex, as they are involved in the regulation of several cellular activities at transcriptional, translational and post-translational levels affecting the cell proliferation, transformation, differentiation and apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008). Furthermore, it has been established that in some way polyamines act as regulators of the virulence of fungal pathogens, taking into account the close relationship between metabolism and biological phenomena such as dimorphism, spore germination, appressorium formation and conidiation (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Khurana *et al.*, 1996; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

Despite the variations of the polyamine metabolism and their functions in eukaryotic and prokaryotic cells, their role as a regulator of various biological processes is primarily due to their cationic nature, which allows them to interact with nucleic acids, membrane phospholipids and some cell wall components. In consequence, the polyamines act stabilizing polyanionic macromolecules, affect the gene expression and the activity of different enzymes including kinases and phosphatases, selectively influence mRNA translation and modulate the regulation of DNA-protein interactions, as well as the apoptotic process (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Pegg, 2009; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid, the etiologic agent of charcoal rot, is a fungal pathogen of economic impact due to its wide spectrum of hosts (containing more than 500 species of plants), including massive consumer grains such as beans, sorghum, cotton and corn, among others (Jana *et al.*, 2003). Charcoal rot affects plants in America, Asia, Africa and some European countries, with a preference for tropical and arid to semi-arid subtropical areas (Islam *et al.*, 2012).

Some of the known virulence mechanisms include the synthesis of toxins and endoglucanases, as well as pycnidia and sclerotia production, whose biogenesis is stimulated

etiológico de la pudrición carbonosa, es un hongo fitopatógeno de gran importancia económica debido a su amplio espectro de hospederos, en el que figuran más de 500 especies de plantas que incluyen granos de consumo masivo como frijol, sorgo, algodón y maíz, entre otros (Jana *et al.*, 2003). Esta enfermedad afecta a plantas de toda América, Asia, África y algunos países de Europa, teniendo especial predilección por aquellas regiones tropicales y subtropicales de áridas a semi-áridas (Islam *et al.*, 2012).

Dentro de los mecanismos de virulencia documentados se incluyen la síntesis de toxinas, endoglucanasas, producción de picnidios y esclerocios, cuya biogénesis es estimulada bajo condiciones de estrés oxidativo e hídrico, garantizando de esta forma la sobrevivencia del patógeno en el suelo por largos periodos de tiempo (Short *et al.*, 1980; Gray *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2012). La secuenciación del genoma de *M. phaseolina*, por su parte, pone en evidencia otros elementos que participan en la patogénesis, tales como enzimas hidrolíticas de carbohidratos y de ligninocelulosa; genes de virulencia implicados en procesos de adhesión, biosíntesis de purinas y micotoxinas; genes implicados con procesos de desintoxicación celular y codificadores de transportadores de aminoácidos y poliaminas, entre otros (Islam *et al.*, 2012). No obstante, pese a la reciente accesibilidad al genoma, la base molecular del proceso fisiopatogénico de este polífago solo se comprende parcialmente, por lo que resulta de interés investigar el papel que desempeñan las poliaminas en la regulación de la virulencia de *M. phaseolina* y su función en el patosistema, teniendo en cuenta la evidencia experimental de su importancia en la interacción planta-microorganismo establecida por otros fitopatógenos. La presente revisión propone un modelo para describir la ruta biosintética de poliaminas en *M. phaseolina*, basado en la secuencia de su genoma, recientemente liberada.

Mecanismos de Biosíntesis y Regulación de las Poliaminas. El mecanismo de biosíntesis de las poliaminas es común en todos los organismos, salvo por algunas particularidades que detallaremos en el presente apartado. La síntesis de poliaminas comienza con la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina, en una reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17), que constituye el paso limitante del metabolismo de estos compuestos. La ornitina puede derivarse del ciclo de la urea, o de la hidrólisis de la arginina por acción de la arginasa (EC 3.5.3.1). La síntesis de la putrescina puede lograrse además, a través de la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19), tal como sucede en bacterias y plantas superiores. Se ha sugerido que la síntesis de putrescina en hongos está determinada principalmente por la actividad de la ornitina descarboxilasa y que al igual que en células de mamíferos, ésta es la única vía de biosíntesis de putrescina (Morgan, 1998; Coffino, 2001; Bagni y Tassoni, 2001; Valdés-Santiago *et al.*, 2012). No obstante, existen reportes que demuestran la actividad de arginina descarboxilasa en una variedad de hongos incluidos fitopatógenos, cuyo crecimiento es inhibido al entrar en contacto con inhibidores de arginina descarboxilasa y de

under oxidative and hydric stress, thus ensuring the survival of the pathogen in soil during long periods of time (Short *et al.*, 1980; Gray *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2012). On the other hand, *M. phaseolina* genome sequencing revealed another elements involved in pathogenesis such as carbohydrate and lignocellulose hydrolytic enzymes, virulence genes involved in adhesion processes, purines and mycotoxin biosynthesis, genes involved in cellular detoxification and encoders of amino acid and polyamines transporters, among others (Islam *et al.*, 2012). However, despite the availability of genomic data, the molecular basis of this pathophysiological process is only partially understood. Thus, it is relevant to investigate the role of polyamines on the regulation of the virulence of *M. phaseolina* and its role within the pathosystem, taking into account experimental evidence observed in other plant pathogens that demonstrate its importance in plant-microbe interactions. This review proposes a model that describes the polyamine biosynthetic pathway in *M. phaseolina*, based on its recently released sequenced genome.

Biosynthesis and Regulation Mechanisms of Polyamines. Polyamine biosynthesis mechanism is common in all organisms, except for some peculiarities that will be detailed in this paragraph. Polyamine synthesis process begins with ornithine decarboxylation to form putrescine in a reaction catalyzed by ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17), which is the rate-limiting enzyme in the metabolism of these compounds. Ornithine originates from urea cycle or from arginine hydrolysis by arginase (EC 3.5.3.1). Putrescine synthesis can also occur through the decarboxylation of arginine by arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19), as in bacteria and higher plants. It has been suggested that synthesis of fungal putrescine is mainly determined by the activity of ornithine decarboxylase and, alikes mammalian cells, is the only biosynthetic pathway of putrescine (Morgan, 1998; Coffino, 2001; Bagni y Tassoni, 2001; Valdés-Santiago *et al.*, 2012). However, there are reports showing arginine decarboxylase activity in a variety of fungi (including phytopathogenic), whose growth is inhibited in presence of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase inhibitors (Khan and Minocha, 1989; Gamarnik *et al.*, 1994; Sannazzaro *et al.*, 2004). The above shows that in some of these organisms, as in the higher plants, the two metabolic pathways can be functional. Organisms that possess a constitutive route to synthesize putrescine via agmatine, also possess arginine decarboxylase and agmatinase (EC 3.5.3.11) enzymes to form putrescine. Some plants have alternative routes to synthesize putrescine via agmatine, involving two major steps: conversion of agmatine to N-carbamoyl putrescine by the action of agmatine iminohydrolase (EC 3.5.3.12) and then to putrescine by the N-carbamoyl putrescine amidohydrolase (EC 3.5.1.53).

The synthesis of the spermine and spermidine occurs by the addition of the aminopropyl groups to putrescine and spermidine precursors, in reactions catalyzed by spermidine synthase (EC 2.5.1.16) and spermine synthase (EC 2.5.1.22), respectively. The aminopropyl groups are donated

ornitina descarboxilasa (Khan y Minocha, 1989; Gamarnik *et al.*, 1994; Sannazzaro *et al.*, 2004). Lo anterior evidencia que en algunos de estos microorganismos, como en las plantas superiores, las dos rutas metabólicas pueden ser funcionales. Los organismos que poseen una ruta constitutiva para sintetizar putrescina vía agmatina, poseen actividad enzimática arginina descarboxilasa y agmatinasa (EC 3.5.3.11) para formar putrescina con eliminación de urea. Algunas plantas poseen rutas alternativas para catalizar la síntesis de putrescina vía agmatina, involucrando dos pasos importantes: transformación de agmatina a N-carbamoylputrescina, por acción de la enzima agmatina iminohidrolasa (EC 3.5.3.12) y formación de putrescina a partir de este intermediario, por acción de N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (EC 3.5.1.53).

La síntesis de las poliaminas espermidina y espermina se logra por adición de grupos aminopropil a los precursores putrescina y espermidina, en reacciones catalizadas por espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) y espermina sintasa (EC 2.5.1.22), respectivamente. Los grupos aminopropil son derivados del compuesto S-adenosilmetionina descarboxilado, que es sintetizado a partir de la descarboxilación de S-adenosilmetionina por S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50). Como ya se mencionó en otro apartado, la síntesis de espermina es característica de los sistemas eucarióticos, sin embargo, no todos los hongos poseen la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar este compuesto (Nickerson *et al.*, 1977).

El proceso biosintético puede revertirse por una serie de reacciones catabólicas que están diseñadas para proporcionar las poliaminas requeridas rápidamente. Este ciclo de interconversión consiste en reacciones de acetilación catalizadas por espermidina/espermina acetiltransferasa (EC 2.3.1.57) y escisión oxidativa subsiguiente, por la enzima dependiente de FAD (flavina adenina dinucleótido), poliamina oxidasa (EC 1.4.3.4). La ruta de biosíntesis de poliaminas es esquematizada en la Figura 1.

La regulación de los niveles de poliaminas constituye un mecanismo esencial para la adecuada supervivencia de la célula, ya que estados carenciales o de síntesis ilimitada pueden generar consecuencias deletéreas (Poulin *et al.*, 1993). Tal proceso se determina principalmente por la actividad de las enzimas ornitina descarboxilasa, S-adenosilmetionina descarboxilasa (ODC y SAMDC, respectivamente) y por la espermina/espermidina acetiltransferasa. Es evidente además, que las poliaminas ejercen un mecanismo de control biosintético por hidrólisis independiente de ubiquitinación, que es gobernado por una proteína inhibidora, denominada antienzima (Az) de la ODC (Heller *et al.*, 1976). La Az actúa como un sensor de poliaminas y se sintetiza a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORFs) sobrepuestos, a través de un cambio de fase +1 en el marco de lectura abierto +1 frameshifting a nivel ribosomal, estimulado por las poliaminas, en un mecanismo inusual de inactivación y reconocimiento de la ODC, para su posterior hidrólisis por el proteasoma 26S (Chattopadhyay *et al.*, 2011). La Az genera una interrupción en la actividad de los

by decarboxylated S-adenosylmethionine, which is synthesized from the decarboxylation of S-adenosylmethionine by S-adenosylmethionine decarboxylase (EC 4.1.1.50). As already mentioned, the synthesis of spermine is typical of eukaryotic systems; however, not all fungi possess the enzymatic machinery necessary to synthesize this compound (Nickerson *et al.*, 1977).

The biosynthetic process may be reversed by a series of catabolic reactions, designed to provide the required polyamines quickly. This retroconversion cycle consists of acetylation reactions catalyzed by spermidine/spermine acetyltransferase (EC 2.3.1.57) and subsequent oxidative cleavage by polyamine oxidase (EC 1.4.3.4), a flavin adenine dinucleotide (FAD) dependent enzyme. A diagram of the polyamine biosynthesis pathway is shown in Figure 1.

Regulation of polyamine levels is essential for cell survival, since deficiency or unlimited synthesis can generate detrimental consequences (Poulin *et al.*, 1993). Such process is mainly governed by the ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase (ODC and SAMDC, respectively) and spermine/spermidine acetyltransferase. The polyamines can also exert a biosynthetic control mechanism by ubiquitin-independent hydrolysis, which is governed by an inhibitory protein known as ODC antizyme (Az) (Heller *et al.*, 1976). Az acts as a polyamines sensor and is synthesized from two overlapping open reading frames (ORFs), through a ribosomal +1 frameshifting stimulated by polyamines, being an unusual mechanism of inactivation and recognition of ODC for further hydrolysis by the 26S proteasome (Chattopadhyay *et al.*, 2011). Az generates a disruption in the activity of the ODC homodimers by binding to the catalytic site forming a non functional heterodimer (ODC-Az). The formation of this heterodimer leads to the exposure of the ODC carboxyl terminus, making it accessible for the recognition by the proteasome; an event which, combined with the stoichiometric inhibition, decreases the half-life of the enzyme and promotes its hydrolysis. The efficiency of ODC proteolysis is provided by a domain within the N-terminal portion of Az. Once the proteasome processes the ODC-Az complex, the next step involves the hydrolysis of ODC and Az release, to continue the regulatory circuit (Coffino, P., 2001). The inhibitory activity of Az is also carried out by the modulation of polyamine transport and can be deregulated by a protein known as antizyme inhibitor (AZI), through an ubiquitination-dependent hydrolysis, which in turn is negatively regulated by polyamines (Palanimurugan *et al.*, 2004).

The translational frameshifting acts as both sensor and effector of the regulatory transport circuit and polyamine biosynthesis. This has been identified in mammals, fungi and protists, suggesting a distribution due to the presence of this mechanism in the last common ancestor of species belonging to three out of four eukaryotic kingdoms (Ivanov and Atkins, 2007). Fungal Az genes are found in at least four different phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota and Zygomycota); Ascomycota contains most of the fungal species with AZ

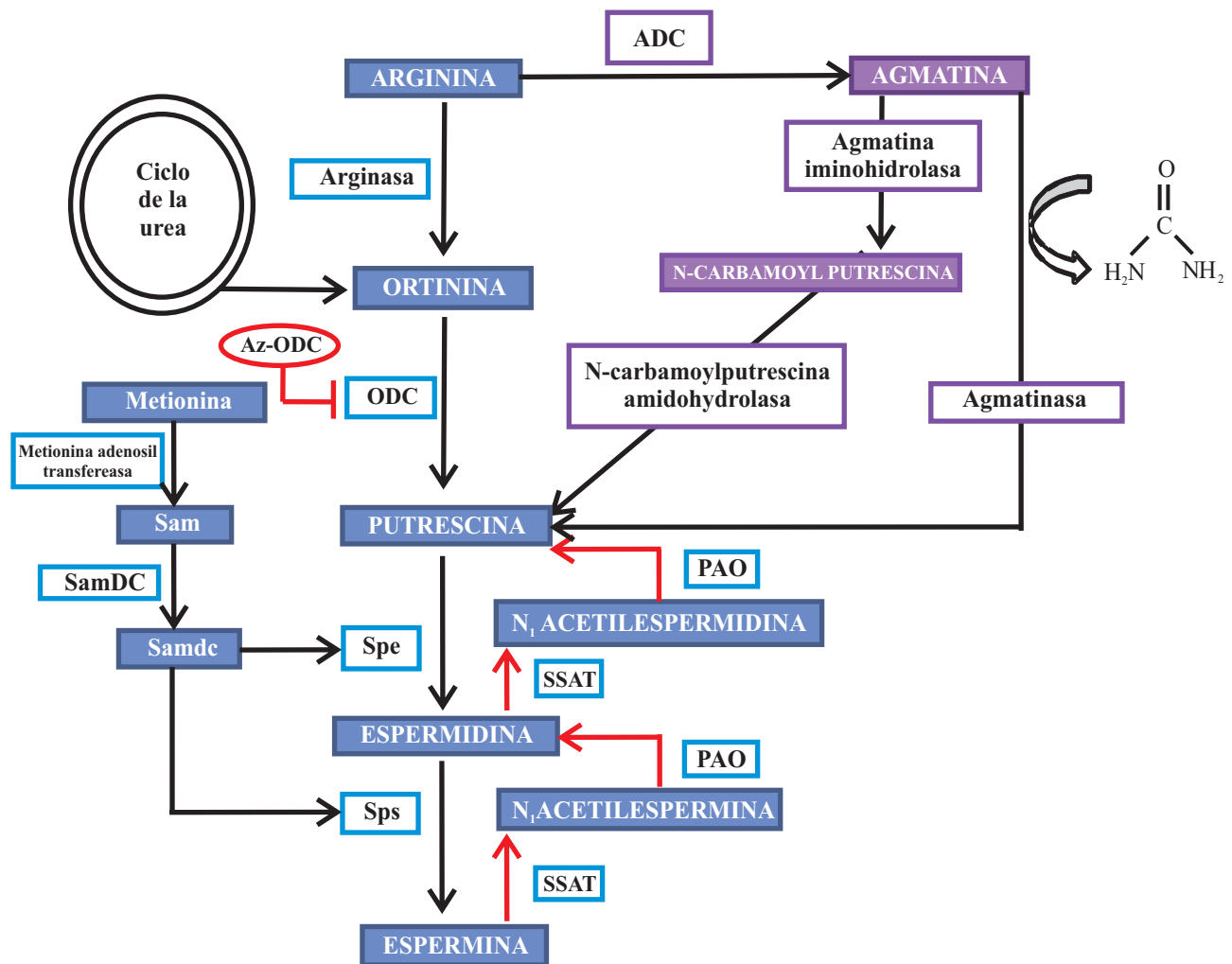


Figura 1. Ruta de biosíntesis y regulación de poliaminas. Se esquematizan las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de las poliaminas. En color azul se representa el mecanismo de biosíntesis de poliaminas compartido por eucariotas y procariotas; y en violeta, la vía alterna que está presente en bacterias, plantas y algunos hongos. En rojo se muestra el mecanismo de interconversión y las reacciones regulatorias de la ruta. En la figura: ODC: Ornitina descarboxilasa; Sam: S-adenosilmetionina; SamDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa; Samdc: Sam descarboxilado; spe: espermidina sintasa; Sps: espermina sintasa; SSAT: espermidina/espermina acetiltransferasa; PAO: poliamina oxidasa; ADC: arginina descarboxilasa; Az-ODC: Antienzima de la ODC.

Figure 1. Polyamines biosynthesis and regulation pathway. Enzymatic reactions involved in polyamines metabolism are shown. Blue boxes indicate polyamines biosynthesis pathway shared by eukaryotas and prokaryotes, whereas violet boxes depict the alternative route exclusive in bacteria, plants and some fungi. Red arrows show polyamine retroconversion mechanism and regulatory reactions. ODC: Ornithine decarboxylase; Sam: S-adenosylmethionine; SamDC: S-adenosylmethionine decarboxylase; Samdc: Sam decarboxylated; Spe: spermidine synthase; Sps: spermine synthase; SSAT: spermidine/spermine acetyltransferase; PAO: polyamine oxidase; ADC: arginine decarboxylase; Az- ODC: ODC antienzyme.

homodímeros de ODC al unirse al sitio catalítico para constituir un heterodímero afuncional (ODC-Az). La formación de este complejo conduce a la exposición del dominio carboxi-terminal de ODC, haciéndolo accesible para reconocimiento por el proteasoma; evento que, sumado a la inhibición estequiométrica, disminuye el tiempo de vida media de la enzima y favorece su hidrólisis. La eficiencia de esta proteólisis está mediada por un dominio que reside en

genes (Ivanov and Atkins, 2007), including *M. phaseolina*. The presence of Az orthologous has been reported in yeast as *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, models in which gene over expression (SPA and OAZ1 genes respectively) inhibited cell division (Ivanov et al. 2000b; Palanimurugan *et al.*, 2004). In the specific case of *S. pombe*, the SPA gene deletion did not produce detectable effects on yeast viability or any other evident

la región N-terminal de la Az. Una vez el proteasoma procesa el complejo ODC-Az, se prosigue con la hidrólisis de ODC y subsecuente liberación de la Az, para dar continuidad al proceso regulador (Coffino, P., 2001). La actividad inhibitoria de la Az también se lleva a cabo por modulación del transporte de poliaminas y puede ser desregulada por una proteína inhibitoria de la antienzima (AZI), a través de un mecanismo de hidrólisis dependiente de ubiquitinación, que a su vez, es regulado negativamente por las poliaminas (Palanimurugan *et al.*, 2004).

El cambio en el marco de lectura traduccional es el sensor y efector del circuito regulador de transporte y biosíntesis de poliaminas, que ha sido identificado en mamíferos, protistas y hongos, sugiriendo que su distribución obedece a la presencia de este mecanismo en el último ancestro común de las especies de tres de los cuatro reinos eucariotas (Ivanov y Atkins, 2007). En hongos, los genes de la Az se encuentran en al menos cuatro diferentes filos, a saber: Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota y Zygomycota; aunque la mayoría de ejemplos corresponden a especies del filo Ascomycota (Ivanov y Atkins, 2007), donde se ubica taxonómicamente *M. phaseolina*.

La presencia de genes ortólogos de la Az ha sido reportada en levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, modelos en los que la sobreexpresión génica (SPA y OAZ1, respectivamente) inhibió la división celular (Ivanov *et al.*, 2000b; Palanimurugan *et al.*, 2004). En el caso particular de *S. pombe*, la delección del gen SPA no produjo efectos detectables sobre la viabilidad de las levaduras o cualquier otro cambio fenotípico manifiesto, salvo la acumulación de poliaminas, que durante la fase estacionaria alcanzó concentraciones 20 veces superiores a las obtenidas en la de crecimiento exponencial, en comparación con las cepas nativas. De acuerdo a lo anterior, se pudo establecer que SPA es el regulador principal de la ODC en este microorganismo y que puede tener actividad a corto y largo plazo (Ivanov *et al.*, 2000b).

Existen cerca de 70 genes que codifican la Az en especies fúngicas, identificados *in silico* (Ivanov y Atkins, 2007). Se conocen las secuencias de *Pneumocystis carinii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces japonicum* y *Schizosaccharomyces octosporus* (Ivanov *et al.*, 2000a). Así mismo, se ha progresado en la identificación de secuencias homólogas de 11 levaduras relacionadas con la Az de *Saccharomyces cerevisiae* (Ivanov *et al.*, 2006).

Papel de las Poliaminas en el Proceso Patogénico de los Hongos Fitopatógenos. Aunque el papel de las poliaminas en los patosistemas no es comprendido del todo, existe evidencia que revela su paradójico papel en la interacción planta-hongo, ya que actúan como moduladores del proceso invasivo del patógeno; y a su vez, del mecanismo defensivo de la planta (Chibucos y Morris, 2006). Constituyen por lo tanto, un sistema finamente regulado cuya disrupción se perfila como una alternativa ideal para el desarrollo de técnicas de control de fitopatógenos. No obstante, deben investigarse las respuestas particulares de los microorganismos, ya que los

phenotypic changes, except for the vast accumulation of polyamines observed during the stationary phase, with concentrations 20 times higher than those observed in exponential growth, compared with native strains. Based on the above, it was inferred that SPA is the main regulator of ODC in this organism and can show activity in the short and long term (Ivanov *et al.*, 2000b).

Nearly 70 genes encoding Az in fungal species have been identified *in silico* (Ivanov and Atkins, 2007). The sequences of *Pneumocystis carinii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces japonicum* and *Schizosaccharomyces octosporus* are known (Ivanov *et al.*, 2000a). Homologous sequences of 11 yeast were also identified closely related to *Saccharomyces cerevisiae* Az (Ivanov *et al.*, 2006).

Role of polyamines in the pathogenic process of phytopathogenic fungi. Although the role of polyamines in the pathosystems has not been fully understood, there is evidence revealing their paradoxical role in plant-fungus interaction, since they act as modulators of both the invasive process of the pathogen and the defense mechanism of the plant (Chibucos and Morris, 2006). Therefore they constitute a tightly regulated system, whose disruption emerges as an ideal alternative for the development of pathogen control techniques. However it is necessary to investigate the particular responses of microorganisms, as existing experimental results demonstrate both the polyamines activity as promoters of seed germination, mycelial growth and development of appressoria sclerotia (Pieckenstain *et al.* 2001; Rajam *et al.* 1986; Reitz, 1995) and its inhibitory effect associated with interactions in calmodulin/calcineurin and cAMP-dependent signaling pathways, important for morphogenesis, adaptation and virulence (Choi *et al.* 1998; Ahn *et al.*, 2003).

Molecular Models of the Pathogenic process by Macrophomina phaseolina. The infective cycle of *M. phaseolina* begins with the spread of sclerotia, highly persistent structures which are the primary source of dissemination. Sclerotia can be found in roots, colonized host tissues, soil and debris from decaying plant tissues. The severity of charcoal rot shows a direct correlation with the population density of sclerotia in soil, which in turn is affected by extreme temperatures (50 °C and -10 °C) (Short *et al.*, 1980). It has also been described that the presence of soybean wastes on soil surface favors the survival of *M. phaseolina* during the winter, as well as the diversity of fungal pathogens and saprophytes which may negatively affect its persistence (Baird *et al.*, 2003). Microsclerotia formation is an event of great importance for the differentiation and survival of filamentous fungi, whose development can be induced by oxidative stress (Georgiou *et al.*, 2006). The general theory of microbial eukaryotic cell differentiation postulates that this phenomenon is activated by hyperoxidative stages, in which the concentration of oxygen free radicals within the cell exceeds its ability to neutralize them. In accordance with this, the oxidative stress produces transitions from undifferentiated states to differentiated states with three possible responses: 1) Cell adaptation mediated by reducing substances, which

resultados experimentales existentes ponen de manifiesto por una parte, la actividad de las poliaminas como promotores de eventos involucrados en la colonización del hospedero, tales como germinación de semillas, crecimiento micelial, desarrollo de apresorios y esclerocios (Pieckenstein *et al.*, 2001; Rajam *et al.*, 1986; Reitz, 1995) y por otra parte, su efecto inhibitorio asociado a interacciones con las cascadas de señalización dependientes de calmodulina/calcineurina y AMP cíclico, importantes para la morfogénesis, adaptación y virulencia (Choi *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2003).

Los Modelos Moleculares del Proceso Patogénico en *Macrophomina phaseolina*. El ciclo infectivo de *M. phaseolina* comienza con la diseminación del esclerocio, fuente primaria de inoculación de elevada persistencia que se encuentra en las raíces y tejidos de hospederos colonizados; suelo y detritus provenientes de tejidos vegetales en descomposición. La severidad de la pudrición carbonosa demuestra una correlación directa con la densidad poblacional de esclerocios presentes en el suelo, que a su vez se ve afectada por temperaturas extremas (50 °C y -10 °C) (Short *et al.*, 1980). También se ha documentado que la presencia de residuos de soja en la superficie del suelo favorece la supervivencia de *M. phaseolina* durante el invierno, así como la diversidad de hongos patógenos y saprófitos que pueden modular negativamente su persistencia (Baird *et al.*, 2003). La formación del microesclerocio es un evento de diferenciación de gran importancia para la supervivencia de los hongos filamentosos, cuyo desarrollo es inducido, entre otros, por estrés oxidativo (Georgiou *et al.*, 2006). La teoría general de diferenciación de los microorganismos eucariotas postula que este fenómeno es activado por estados hiperoxidantes, esto es, estados en los que la concentración de radicales libres de oxígeno en el interior celular, superan su capacidad para neutralizarlos. De acuerdo a este postulado, el estrés oxidativo media la transición de estados indiferenciados a estados diferenciados, con tres posibles respuestas: 1) adaptación celular mediada por sustancias reductoras que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS), con subsecuente retorno al estadio original; 2) la célula alcanza un estado de diferenciación más estable, limitando la entrada de oxígeno ambiental y 3) muerte celular por incapacidad para reducir o limitar la entrada de oxígeno. Los estados indiferenciados y aquéllos diferenciados corresponden a estados de estabilidad celular, que en el caso del esclerocio, son resultado del aislamiento autónomo del oxígeno ambiental, a través de la generación de estructuras impermeables al oxígeno (Georgiou *et al.*, 2006). Otros autores han demostrado la estrecha relación entre el estrés oxidativo y la diferenciación esclerótica de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii* y *Sclerotinia minor* (Patsoukis y Georgiou, 2007; Papapostolou y Georgiou, 2010). Diferentes estudios han revelado el papel de las poliaminas como agentes protectores frente al estrés oxidativo (Gropa *et al.*, 2001; Fujisawa *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2006), demostrando la correlación directa que existe entre el número de grupos amino de sus moléculas y su poder

neutralize reactive oxygen species (ROS) with a subsequent return to the original stage, 2) cells reaches a more stable state of differentiation, limiting the entry of atmospheric oxygen, and 3) cell death caused by an inability to reduce or limit the entry of oxygen.. Both undifferentiated and differentiated states correspond to states of cellular stability, which in the case of sclerotia, are the result of atmospheric oxygen isolation through the generation of oxygen-impermeable structures (Georgiou *et al.*, 2006). Several studies have demonstrated the close relationship between oxidative stress and the sclerotic differentiation of fungi as *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfii* and *Sclerotinia minor* (Patsoukis and Georgiou, 2007; Papapostolou and Georgiou, 2010), as well as the role of polyamines as protective agents against oxidative stress (Gropa *et al.* 2001; Fujisawa *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2006) with a direct correlation between the number of amino groups molecules and their antioxidant (Lovaas, 1991). Shapira *et al.* (1989) reported that during the sclerotia formation in *Sclerotium rolfii* the endogenous polyamine levels decreases, but in contrast, increases during the germination of sclerotia and mycelial growth.

Based on all the aspects discussed above, we propose that polyamines can modulate the *M. phaseolina* pathogenic process by regulation of sclerotial biogenesis, which could be inhibited due to their activity as free radical scavengers and to their ability to neutralize lipid peroxidation. However, once the different substates of sclerotial development are reached, polyamines may be involved in the stabilization of these differentiated structures and promote sclerotial germination, which results in hyphal growth towards the host surface, prior to penetration (Dhingra and Sinclair, 1978).

Appresorial formation is another feature of infective cycle of *M. phaseolina* (Ammon *et al.*, 1975). Appresoria is formed from germ tube and it promotes adhesion to epidermal tissue and host colonization, with the aid of cell-wall degrading enzymes, which in turn support the invasive process (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). *M. phaseolina* can also penetrate through wounds or natural openings, which are another way to get access into the host (Kaur *et al.*, 2012). The role of polyamines in the regulation of appresorial development has been studied in *Magnaporthe griseae* and *Uromyces viciae-fabae*. It was observed that the addition of ODC, SAMDC and spermidine synthase inhibitors can prevent partially or completely appresorium formation by uredospores of *Uromyces viciae-fabae*, even using SAMDC inhibitor at concentrations as low as 0.025 mM. Indeed, reduction of appresorium development ranged between 63-100 % and conidia germination was unaffected (Reitz *et al.*, 1995). In the case of *Magnaporthe griseae* the effect of exogenously added putrescine, spermine and spermidine on conidial suspension was tested. It was reported that polyamines impair appresorium formation by depress of cAMP, an important modulator of appresorium development in *M. griseae*. In this case, the inhibitory effect of polyamines was reversed by treatment with cAMP (Choi *et al.*, 1998).

Appresorium differentiation and maturation are key

antioxidante (Lovaas, 1991). Shapira *et al.* en 1989, describieron que durante la formación del esclerocio de *Sclerotium rolfsii*, el nivel de poliaminas endógenas disminuye; pero incrementa durante la germinación del esclerocio y el crecimiento micelial.

Basados en estas observaciones, proponemos que las poliaminas pueden ejercer un efecto modulador del proceso patogénico de *M. phaseolina*, por medio de la regulación de la esclerogénesis, que puede ser inhibida gracias a su actividad como secuestradores de radicales libres y a su capacidad para neutralizar los procesos de peroxidación lipídica. No obstante, es claro que una vez se alcanzan los diferentes estadios de maduración del esclerocio, estos metabolitos pueden participar en la estabilización de los estados diferenciados y estimular su germinación, que resulta en el crecimiento de la hifa en dirección a la superficie hospedadora, antes de la penetración (Dhingra y Sinclair, 1978).

La formación de apresorio es otra de las características del proceso infectivo de *M. phaseolina* (Ammon *et al.*, 1975). Su desarrollo deriva de la formación del tubo germinal y favorece la adherencia e invasión del hospedador a través de su epidermis, coadyuvado por enzimas que hidrolizan la pared celular y a su vez, favorecen el proceso invasivo (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). La entrada del fitopatógeno también puede estar mediada por lesiones del tejido vegetal que constituyen otra puerta de entrada para el microorganismo (Kaur *et al.*, 2012). La participación de las poliaminas en la regulación del desarrollo del apresorio ha sido estudiada en hongos como *Magnaporthe griseae* y *Uromyces viciae-fabae*. Se encontró que el uso de inhibidores de ODC, SAMDC y espermidina sintasa, reduce parcial o completamente la formación del apresorio por uredosporas de *Uromyces viciae-fabae*, haciendo uso de concentraciones tan bajas como 0.025 mM del inhibidor de SAMDC; en general, la reducción de la formación del apresorio a las diferentes concentraciones evaluadas, osciló entre 63-100 % y no se obtuvo efecto alguno sobre la germinación de las conidias (Reitz *et al.*, 1995). En el caso de *Magnaporthe griseae*, se evaluó el efecto de la adición de putrescina, espermina y espermidina a nivel exógeno, sobre una suspensión de conidias; el experimento puso en evidencia la capacidad de las poliaminas para reducir el AMP cíclico, importante modulador de la formación del apresorio en este fitopatógeno, con la subsecuente inhibición de esta estructura; efecto que se revirtió al adicionar el AMPc (Choi *et al.*, 1998).

La diferenciación y maduración del apresorio son eventos críticos en el desarrollo de la infección, por lo que resulta de interés abordar un diseño experimental que permita evaluar el papel que desempeñan las poliaminas en la formación del apresorio, en *M. phaseolina*.

Una vez el patógeno ha penetrado la pared celular epidérmica, la colonización del tejido vascular que resulta del crecimiento intracelular de las hifas, constituye la siguiente etapa del proceso patogénico. El crecimiento del micelio es un evento relacionado con los niveles endógenos de poliaminas. Estudios en *Glomus mosseae* sugieren que la elevada concentración de poliaminas exógenas (10 mM)

process in the infection development. Therefore there is a need of experimental examination that allows knowing the role of polyamines in the appressorium development of *M. phaseolina*.

After penetration of host epidermis cell walls, the intracellular hyphal growth begins, colonizing the vascular tissue, which constitutes the second stage of the pathogenic process. The mycelial growth is an event related to endogenous levels of polyamines. Studies in *Glomus mosseae* suggest that at high concentration of exogenous polyamines (10mM) may be a growth limiting factor whilst they can be exert stimulating effect on growth at low concentrations (1mM). High levels of polyamines can also generate toxic effects on plants, which could be the result of several alterations of physiological process due to polyamines accumulation such as membrane cell depolarization, which increases the cations linkage (K⁺, Mg²⁺) or accumulation of oxidation products of polyamines, hydrogen peroxide and free radicals, which could have deleterious effects on organisms (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Other reports have described the putrescine role in the mycelial growth of *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996) and *Yarrowia lipolytica* dimorphic transition (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001).

Functions of polyamines have also been studied in others morphological events of fungi, which showed the biosynthetic activity of these polycations during germ tub elongation and spores germination; consequently, *Aspergillus flavus* requires a high putrescine/spermidine ratio for the proper development of these process whilst the spore differentiation to microcycle conidiation is favored at low putrescine/spermidine ratio; these findings have shown the spermidine role in the cell differentiation and spore differentiation to microconidiation, characteristic of fungi belonging to this genus (Khurana *et al.*, 1996). Although there are no reports on the ability to induce microcycle conidiation in *M. phaseolina*, the implications of polyamines in cell differentiation and sporogenesis are critical to the advancement of the knowledge of the regulatory mechanisms of invasion and colonization process in this pathogen.

The production of phytotoxins in *M. phaseolina*, like in other plant pathogens, favors the host colonization; however, their role in the disease development is still not fully understood. The sequence of the *M. phaseolina* genome confirms the existence of non-ribosomal peptide synthetases, which catalyze the production of cyclic peptides including numerous mycotoxins (Islam *et al.*, 2012). Previous research using ODC inhibitor and nonsporulating *Aspergillus parasiticus* mutants has shown the correlation between the regulation of aflatoxins biosynthesis and sporulation process (Guzmán-de-Peña and Ruiz-Herrera, 1997) which in turn, is modulated by polyamines metabolism. Understanding the regulation mechanisms of toxins synthesis (related to regulation of spore pigment biosynthesis in other fungi) in *M. phaseolina* will allow comprehension of the micotoxins role as a pathogenic and virulence factors in different isolates.

Polyamines Metabolic Pathway in

puede ser un factor limitante del crecimiento, o ejercer efectos estimulantes a bajas concentraciones (1mM). Niveles elevados de poliaminas también pueden generar toxicidad en plantas, como resultado de la alteración de diferentes efectos fisiológicos por acumulación de poliaminas, dentro de los que se cuentan la despolarización de la membrana celular, que aumenta la fuga de cationes (K⁺, Mg²⁺), o la acumulación de los productos de la oxidación de las poliaminas, peróxido de hidrógeno y radicales libres, que pueden tener efectos deletéreos sobre el microorganismo (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Otros estudios han revelado el papel de la putrescina en el crecimiento del micelio de *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996) y en la transición dimórfica de *Yarrowia lipolytica* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001).

La función de las poliaminas también ha sido estudiada en otros eventos morfogénicos de los hongos, que ponen de manifiesto la actividad biosintética de estos poliaminas durante la elongación del tubo germinal y la germinación de esporas; se ha reportado que para el desarrollo de estos procesos, *Aspergillus flavus* requiere una alta tasa de putrescina/espermidina, mientras que la diferenciación de esporas bajo el microciclo de conidiación se favorece con una baja tasa de putrescina/espermidina; esto revela el papel que ejerce la espermidina en los procesos de diferenciación celular y desarrollo de las conidias bajo el microciclo de conidiación, característico de hongos de este género (Khurana *et al.*, 1996). Aunque no existen reportes sobre la inducción del microciclo de conidiación en *M. phaseolina*, las implicaciones de las poliaminas en la diferenciación celular y esporogénesis son de trascendental interés para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de regulación del proceso de invasión y colonización de este patógeno.

La producción de fitotoxinas en *M. phaseolina*, al igual que sucede con otros fitopatógenos, favorece el proceso de colonización del hospedero; sin embargo, su papel en el desarrollo de la enfermedad no ha sido comprendido del todo. La secuencia del genoma de este microorganismo confirma la existencia de sintetasas peptídicas no ribosomales, que catalizan la producción de péptidos cíclicos en donde se incluyen numerosas micotoxinas (Islam *et al.*, 2012). Estudios con un inhibidor de la ODC y cepas no esporogénicas de *Aspergillus parasiticus* han permitido demostrar la correlación existente entre la regulación de la producción de aflatoxinas y el proceso de esporulación (Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera, 1997), que está modulado a su vez, por el metabolismo de las poliaminas. El conocimiento de los mecanismos de regulación de la síntesis de toxinas en *M. phaseolina*, dada su estrecha relación con los mecanismos de regulación de la síntesis de pigmentos de las esporas de otros hongos, permitirá comprender las implicaciones que tienen en el proceso patogénico y dilucidar a detalle su papel como mecanismos de patogenicidad y virulencia en aislamientos particulares.

Ruta Metabólica de Poliaminas en *Macrophomina phaseolina*. La ruta metabólica de poliaminas que proponemos como modelo en *M. phaseolina*

***Macrophomina phaseolina*.** The *M. phaseolina* polyamine metabolic pathway proposed in this paper (figure 2) was deduced by a BLAST analysis of reference proteins of *Magnaporthe oryzae*, because this phytopathogenic fungus has the lowest relative phylogenetic distance to *M. phaseolina*, and sequences are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (Crous *et al.*, 2006). When it was not possible to carry out analysis with sequences belonging to this microorganism, we used fungi of the genus *Aspergillus*, *Laccaria*, and *Verticillium*. Table 1 shows the accession numbers and identity percentages of the polyamine metabolic pathway proteins with not annotated sequences in the *M. phaseolina* genome.

According to our in silico analysis we can conclude that *M. phaseolina* possesses the enzymatic machinery to synthesize spermine, unlike the report of Nickerson *et al.* in 1977. Our observations are consistent with previous reports attributing the absence of detectable levels of spermine to unfavorable physiological regulatory conditions for its production (e.g. temperature, magnesium or manganese concentrations, etc.) (Marshall *et al.*, 1979). Spermine production by *M. phaseolina* is particularly relevant because of its association with the function of the sclerotia as resting bodies and the transition from mycelium to mature sclerotia in *S. rolfisii* (Shapira *et al.*, 1989) as well as the growth of mycelium and sclerotia maturation in *Sclerotinia sclerotiorum* (Gárriz *et al.*, 2008). Spermine has been implicated in several cellular functions in eukaryotic cells able to synthesize it, such as blocking and modulation of ion channels, regulation of translation, cellular growth processes in mammals (Stevens and Winther, 1979; Williams 1997; Mandal *et al.*, 2013) and furthermore, is required for α -alanine biosynthesis, a metabolic intermediary in Coenzyme A biosynthesis, in yeasts (White *et al.*, 2001).

We have found that *M. phaseolina* genome possesses homologous sequences with all regulatory proteins involved in polyamine metabolic pathway described in other organisms, which maximizes the polyamine availability according to particular cellular requirements. The presence of ODC antizyme is an additional evidence that reaffirms the evolutionary conservation of this mechanism; however further studies are necessary to demonstrate its peculiarities, and especially to elucidate the antizyme negative control mechanism, which seems to be different for each fungus and differs from the ODC regulation mechanism described for higher eukaryotes (Ivanov *et al.* 2000b).

Our homology analysis do not allow us to confirm the existence of an alternative route for putrescine synthesis driven by arginine decarboxylase (ADC), since the identity percentage obtained by comparing ADC sequences of *Arabidopsis thaliana* with those of *M. phaseolina* (annotated as ornithine/DAP/Arginine decarboxylase) was only 24 % (E-value: 5e-04). Since there are no available fungal reference proteins for ADC in the gene bank database, we consider necessary to experimentally test the effects of over-expression of the Az annotated in its genome, in order to determine whether ornithine decarboxylation is

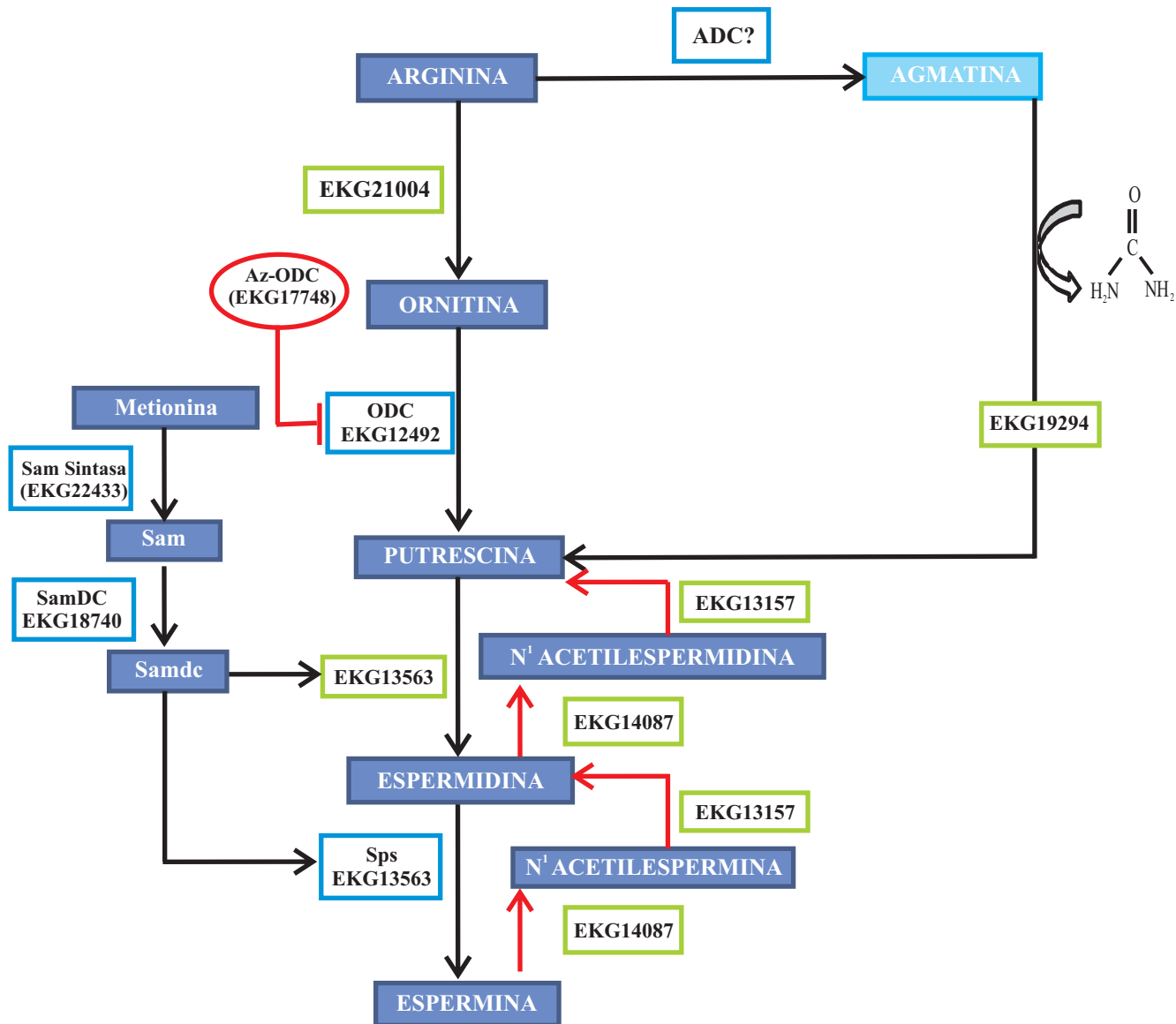


Figura 2. Modelo del metabolismo de las poliaminas en *M. phaseolina*. Los números de acceso que se muestran en los recuadros verdes corresponden a las enzimas homólogas del metabolismo de las poliaminas identificadas en el genoma de *M. phaseolina* por medio de un análisis BLAST. Los recuadros azules indican los números de acceso de las enzimas homólogas anotadas en el genoma del microorganismo. Las flechas en rojo corresponden a la ruta catabólica.

Figure 2. The model of polyamine metabolism in *M. phaseolina*. Green boxes show the accession numbers to homologous enzymes of the polyamines metabolism identified in the *M. phaseolina* genome by BLAST analysis. Blue boxes indicate the access numbers of the homologous enzymes with annotated sequences in the *M. phaseolina* genome. The red arrows show the catabolic pathway.

(Figura 2) fue construida por medio de un análisis BLAST, usando proteínas de referencia de *Magnapothe oryzae*, por tratarse del fitopatógeno que presenta la menor distancia filogenética (Crous *et al.*, 2006) con información disponible en la base de datos del NCBI. En los casos en los que no fue posible hacer el análisis con este microorganismo, se utilizaron hongos del género *Aspergillus*, *Laccaria* y *Verticillium*. La Tabla 1 muestra los números de acceso y porcentajes de identidad obtenidos

the only source of putrescine in *M. phaseolina*, as has been demonstrated in *S. pombe* (Ivanov *et al.*, 2000b). We do not recommend using ODC inhibitors as a strategy to test ADC activity in this organism, mainly because fungal resistance to inhibitors such as difluoromethylomithine (DFMO) has been reported in *Septoria tritici* and *Ustilago maydis* (Smith *et al.*, 1992; Walters, 1995).

PERSPECTIVES AND CONCLUSIONS

Tabla 1. Identificación *in silico* de proteínas homólogas para el metabolismo de poliaminas en el genoma de *Macrophomina phaseolina*. Se muestran los resultados obtenidos por medio de análisis BLAST para identificación de enzimas homólogas relacionadas con el metabolismo de las poliaminas en el genoma de *M. phaseolina*, por comparación con secuencias proteicas de referencia de otros hongos disponibles en base de datos del NCBI. Se muestran los números de acceso para las secuencias homólogas en el genoma de *M. phaseolina*, el porcentaje de identidad, la cobertura y significancia del análisis.

Table 1. *In silico* identification of *Macrophomina phaseolina* homologous proteins involved in polyamine metabolism. Table shows the BLAST analysis to identify homologous enzymes involved in the metabolism of polyamines, in comparison with reference protein sequences of several fungal species available at NCBI database. Accession numbers for the sequences shown homologous to the genome of *M. phaseolina*, the percent identity, coverage and significance analysis

Número de acceso <i>M. phaseolina</i>	% de identidad	Cobertura	Significancia (Valor-E)	Proteína homóloga	Tamaño (aa)	Organismo de referencia (número de acceso)
EKG13563	84 %	99 %	0.0	Espermidina sintasa	292	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 (XP_752719)
EKG13563	84 %	98 %	0.0	Espermidina sintasa	292	<i>Magnaporthe oryzae</i> (XP_003712083)
EKG14087	46 %	97 %	4e-37	Diamina N- acetiltransferasa	181	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82 (XP_001881287)
EKG13157	39 %	97 %	2e-114	Poliamina oxidasa	534	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 (XP_001392310)
EKG13157	51 %	93 %	3e-151	Poliamina oxidasa	534	<i>Verticillium albo- atrum</i> VaMs. 102 (XP_003008145)
EKG13157	58 %	93 %	0.0	Poliamina oxidasa dependiente de flavina	534	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 (XP_747726)
EKG1004 (ureohidrolasa)	77 %	70 %	2e-137	Arginasa	244	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15 (XP_003713240)
EKG19294	58 %	89 %	2e-143	Agmatinasa	401	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15 XP_003718599)
EKG14788	24 %	27 %	5e-04	Arginina descarboxilasa	447	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_974684)

para aquellas proteínas de la ruta metabólica que no se encuentran anotadas en el genoma de *M. phaseolina*.

De acuerdo a los hallazgos del análisis *in silico* es posible afirmar que *M. phaseolina* cuenta con la maquinaria enzimática para sintetizar espermina, a diferencia de lo

The experimental confirmation of the processes proposed in this review, as well a thorough analysis of the *M. phaseolina* genome, will help to make progress in the knowledge of polyamine metabolism and their role in the pathogenicity and virulence of *M. phaseolina*, in order to

reportado por Nickerson *et al.* en 1977. Nuestros hallazgos son consistentes con las observaciones de otros autores que atribuyen la ausencia de niveles detectables de espermina en los hongos filamentosos evaluados, a las desfavorables condiciones de regulación fisiológica bajo las cuales se produjo esta poliamina (temperatura, concentración de magnesio o manganeso, etc.) (Marshall *et al.*, 1979). La producción de espermina por *M. phaseolina* reviste particular interés, ya que se trata de un metabolito asociado a la función del esclerocio como estructura de resistencia y a la transición del micelio a esclerocio maduro en *S. rolfisii* (Shapira *et al.*, 1989); así como a la maduración del esclerocio y crecimiento del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Gárriz *et al.*, 2008). Se sabe además, que esta tetramina participa en diversas funciones celulares de los eucariotas que la sintetizan, tales como modulación o bloqueo de canales iónicos; regulación de la traducción; crecimiento celular en mamíferos (Stevens y Winther, 1979; Williams, 1997; Mandal *et al.*, 2013) y que es requerida para la biosíntesis de β -alanina, un intermediario metabólico de la biosíntesis de Coenzima A, en levaduras (White *et al.*, 2001).

Se encontró homología con todas las proteínas reguladoras de la ruta metabólica descritas para otros organismos, lo que garantiza la disponibilidad de las diferentes poliaminas según los requerimientos celulares de *M. phaseolina*. La presencia de la antienzima de ODC, constituye una evidencia adicional que reafirma la conservación evolutiva de este mecanismo, sin embargo es necesario demostrar experimentalmente sus particularidades, especialmente para dilucidar el mecanismo de control negativo de la antienzima, que aparentemente varía de hongo a hongo y difiere de los mecanismos de regulación de ODC, descritos para eucariotas superiores (Ivanov *et al.*, 2000b).

Los resultados del análisis de homología no nos permiten confirmar la existencia de una ruta alternativa para síntesis de putrescina por actividad de arginina descarboxilasa (ADC), ya que el porcentaje de identidad obtenido al comparar la secuencia de esta enzima en *Arabidopsis thaliana* con aquella de *M. phaseolina* (anotada en el genoma como Ornitina/DAP/Arginina descarboxilasa) fue solo de 24 % (valor E: 5e-04). No existen ADC fúngicas de referencia disponibles en el banco de datos, por lo que proponemos poner a prueba experimentalmente los efectos de la sobre expresión de la Az anotada en su genoma, para dilucidar si la descarboxilación de la ornitina es la única fuente de putrescina en *M. phaseolina*, tal como se ha demostrado en *S. pombe* (Ivanov *et al.*, 2000b). Consideramos que el uso de inhibidores de la ODC como estrategia para evaluar actividad ADC en este hongo, no es la alternativa más adecuada, puesto que la insensibilidad a algunos inhibidores como difluorometilornitina (DFMO) ha sido reportada en *Septoria tritici* y *Ustilago maydis* (Smith *et al.*, 1992; Walters, 1995).

PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

La evaluación experimental de las características que ponemos en evidencia en el presente documento, así como la

improve the control strategies for *M. phaseolina* from the pathosystem perspective. It is also necessary to focus in the search of alternative routes for the synthesis of putrescine via agmatine, to determine whether ADC activity is present in this organism and the potential genetic regulatory mechanisms controlling this route.

Acknowledgements. This work was conducted at Laboratorio de Biotecnología Vegetal, in Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Mexico and was supported by SIP number 20120551 and CB- 2011-01 169 827 grants. M.V. Roa-Cordero want to thank Universidad de Santander (UNDES) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support during her M.Sc. studies.

LITERATURA CITADA

- Ahn, I.P., Kim, S., Choi, W.B., and Lee, Y.H. 2003. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. *FEMS Microbiology Letters* 227: 237-241.
- Ammon, V., Wyllie, T.D., and Brown, M.F. Jr. 1975. Investigation of the infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55:77-81.
- Bagni, N., and Tassoni, A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Baird, R.E., Watson, C.E., and Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease*. 87:563-566.
- Chattopadhyay, M.K., Park, M.H., and Tabor, H. 2008. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *PNAS* 105: 6554-6559.
- Chattopadhyay, M.K., Fernandez, C., Sharma, D., McPhie, P., and Masison, D.C. 2011. Yeast ornithine decarboxylase and antizyme form a 1:1 complex in vitro: purification and characterization of the inhibitory complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406: 177-182.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C. W., and Tabor, H. 2006. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 751-761.
- Chibucos, M.C., and Morris, P.F. 2006. Levels of polyamines and kinetic characterization of their uptake in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3350-3356.
- Choi, W.B., Kang, S.H., Lee, Y.W., and Lee, Y.H. 1998. Cyclic AMP restores appressorium formation inhibited by polyamines in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 88:58-62.
- Coburn, R.F. 2009. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI (4, 5) P2. *Journal of cell physiology* 221: 544-551.

investigación detallada del genoma de *M. phaseolina* para encontrar otras, permitirán avanzar en la comprensión del metabolismo de las poliaminas en este patógeno y dilucidar su papel en los procesos de patogenicidad y virulencia, con miras a mejorar las estrategias de control del hongo desde la perspectiva integral del patosistema. Es necesario además, concentrar algunos esfuerzos para determinar la existencia de una ruta alternativa para la síntesis de putrescina vía agmatina, que nos permitan dilucidar si la actividad ADC está presente en este microorganismo y de ser así, explorar las condiciones de regulación genética bajo las cuales esta ruta podría ser activa.

Agradecimientos. Este trabajo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo el financiamiento de los proyectos: SIP número 20120551 y CB-2011-01 169827. M.V. Roa-Cordero agradece a la Universidad de Santander (UDES), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo para la realización de estudios de Maestría.

- Coffino, P. 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 188-194.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology* 55: 235-253.
- Desforges, B., Curmi, P.A., Bounedjah, Q., Nakib, S., Hamon, L., De Bandt, J-P., and Pastré, D. 2013. An Intercellular polyamine transfer via gap junctions regulates proliferation and response to stress in epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. D.O.I: 10.1091/mbc.E12-10-0729.
- Dhingra, O.D., and Sinclair J. B. 1987. *Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina*. Vicosa, Brazil, Universidad Federal de Vicosa.
- El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D., and Gianinazzi, S. 1996. Effect of polyamines in *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 100: 597-600.
- Elad, Y. 1991. An inhibitor of polyamine biosynthesis difluoromethylornithine and the polyamine spermidine for the control of gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 19:201-209.
- Fujisawa, S., and Kadoma, Y. 2005. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer research* 25:965-970.
- Gamarnik A., Frydman, F.R., and Barreto, D. 1994. Prevention of infection of soybean seeds by *Colletotrichum truncatum* by polyamine biosynthesis inhibitors. *Phytopathology* 84: 1445-1448.
- Gárriz, A., Gonzalez, M.E., Marina, M., Ruiz, O.A., and Pieckenstein, F.L. 2008. Polyamine metabolism during sclerotial development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological research* 112: 414-422.
- Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., and Zervoudakis, G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46: 691-712.
- Gray, F.A., Mihail, J.D., Lavign, R.J., and Porter, P.M. 1991. Incidence of charcoal rot of sorghum and soil populations of *Macrophomina phaseolina* associated with sorghum and native vegetation in Somalia. *Mycopathologia* 114: 145-151.
- Groppa, M. D., and Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Groppa, M., Tomaro, M., and Benavides, M. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161: 481-488.
- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C., and Ruiz-Herrera, J. 1993. The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology* 137: 485-493.
- Guzmán-de-Peña, D., and Ruiz-Herrera, J. 1997. Relationship between Aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 21:198-205.
- Heby, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19:1-20.
- Heller, J.S., Fong, W.F., and Canellakis, E.S. 1976. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1858-1862.
- Iacomino, G., Picariello, G., and D'Agostino, L. 2012. DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 1745-1755.
- Igarashia, K., and Kashiwagic, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42: 39-51.
- Islam, S., Haque, S., Islam, M.M., Emdad, E.M., Halim, A., Hossen, M., Hossain, Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, S., Alam, M., Hou, S., Wan, X., Saito, J.A., and Alam, M. 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13:493.
- Ivanov, I.P., and Atkins, J.F. 2007. Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation. *Nucleic Acids Research* 35: 1842-1858.
- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F. and Atkins, J. F. 2006. Evolutionary specialization of recoding: Frameshifting in the expression of *S. cerevisiae* antizyme mRNA is via an atypical antizyme shift site but is still + 1. *RNA* 12: 332-337.
- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 2000a. Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Research* 28: 3185-3196.
- Ivanov, I.P., Matsufuji, S., Murakami, Y., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 2000b. Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals. *EMBO Journal* 19:1907-1917.

- Jana, T., Sharma, T.R., Prasad, R. D., and Arora, D. K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research* 158: 249-257.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz-Herrera, J., and Domínguez, L. 1977. A. 2001. Disruption of gene YIODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 1:195-204.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R., and Chauhan, V.B. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 2012:1-16.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., and Galston, A.W. 1988. Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Plants* 173:282-284.
- Khan, A.J., and Minocha, S.C. 1989. Biosynthetic arginine decarboxylase in phytopathogenic fungi. *Life Sciences* 44: 1215-1222.
- Khurana, N., Saxena, R. K., Gupta, R., and Rajam, M. V. 1996. Polyamines as modulators of microcycle conidiation in *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 142: 517-523.
- Lovaas, E. 1991. Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68:353-358.
- Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H.E., Orjalob, A.V., and Parka, M.H. 2013. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *PNAS* 110 : 2169-2174.
- Marshall, M., Geraldine Russo, G., Van Etten, J., and Nickerson, K. 1979. Polyamines in dimorphic Fungi. *Current Microbiology* 2:187-190.
- Mayek-Pérez N., Garcia-Espinosa, R., López-Castaneda, C., Acosta Gallegos, J. A., and Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology, and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 185-195.
- Morgan, D.L.M. Polyamines: an introduction. 1998. pp. 3-30. *In: Morgan DML (ed.). Polyamine protocols. Vol.79. Human Press, Totowa, New Jersey, USA. 186p.*
- Nickerson, K.W., Dunkle, L.D., and Van Etten, J.1977. Absence of spermine in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology* 129: 173-176.
- Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K., and Dohmen, R.J. 2004. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO Journal* 23: 4857-4867.
- Papapostolou, I., and Georgiou, C.D. 2010. Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* 156: 960-96.
- Patsoukis, N., and Georgiou, C.D. 2007. Effect of thiol redox state modulators on oxidative stress and sclerotial differentiation of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* 188: 225-233.
- Pegg, A. E. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61: 880-894.
- Pieckenstain, F.L., Garriz, A., Chornomaz, E.M., Sanchez,D.H., and Ruiz, O.A. 2001. The effect of polyamine biosynthesis inhibition on growth and differentiation of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 245-253.
- Poulin, R., Coward, J.K., Lakanen, J.R., and Pegg, A.E. 1993. Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 4690-4698.
- Rajam, M.V., Kumria, R., and Singh, S. 2004. Molecular biology and genetic engineering of Polyamines in plants. pp. 60-77. *In: Srivastava PS, Narula A and Srivastava S (eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers, New Delhi, India.420p.*
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., and Galston, A.W. 1986. Kinetic studies on the control of the bean rust fungus (*Uromyces phaseoli* L.) by an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Plant Physiology* 82: 485-487.
- Reitz, M., Waiters, D., and Moerschbacher, B. 1995. Germination and appressorial formation by uredospores of *Uromyces viciae-fabae* exposed to inhibitors of polyamine biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology* 101: 573-578.
- Sannazzaro, A., Álvarez, C.L., Mendez, A. B., Pieckenstain, L., Albertó, E. O., and Ruíz, O. A. 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters* 230:115-121.
- Shapira, R., Altam, A., Henis, Y., and Chet, L. 1989. Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 135: 1361-1367.
- Short, G.E., Wyllie, T.D., and Bristow, P.R. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70: 13-17.
- Smith, T. A., Barker, J. H. A., and Owen, W. J. 1992. Insensitivity of *Septoria tritici* and *Ustilago maydis* to inhibitors of ornithine decarboxylase. *Mycological Research*. 96:395-400.
- Stevens, L., and Winther, M.D. 1979. Spermine, spermidine and putrescine in fungal development. *Advances in Microbial Physiology* 19:63-148.
- Tabor, C.W., and Tabor, H. 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews* 49: 81-99.
- Tisi, A., Federico, R., Moreno, S., Lucretti, S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., Angelini, R., and Cona, A. 2011. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiology* 157:200-215.
- Urdiales, J. L., Medina, M.A., and Sanchez-Jimenez, F. 2001. Polyamine metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13: 1015-

1019.

- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J.A., León-Ramírez, C.G., and Ruiz-Herrera, J. 2012. Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *Journal of Amino Acids* 2012: 1-13.
- Walters, D. R. 1995. Inhibition of polyamine biosynthesis in fungi. *Mycol. Res.* 99:129-139.
- White, W. H., Gunyuzlu, P.L., and Toyn, J.H. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of β -alanine production from spermine. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10794-10800.
- Williams, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal* 325: 289-297.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F.E. 2011. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181:593-603.

Influencia de Tipos de Estacas en la Incidencia de Pudriciones Radicales de Yuca (*Manihot esculenta*)

Influence of Cuttings on Root Rot Incidence in Cassava (*Manihot esculenta*)

Maryluz Folgueras Montiel, Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba; **Sergio Rodríguez Morales**, Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba; **Lidcay Herrera Isla**, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Carretera a Camajuaní, km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba y **Robersy Sánchez Rodríguez**, Centro de Estudios de Informática (CEI), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Carretera a Camajuaní, km. 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Correspondencia: maryluz@inivit.cu

(Recibido: Julio 25, 2011 Aceptado: Septiembre 11, 2012)

Folgueras Montiel M, Rodríguez Morales S, Herrera Isla L y Sánchez Rodríguez R. 2013. Influencia de Tipos de Estacas en la Incidencia de Pudriciones Radicales de Yuca (*Manihot esculenta*). Revista Mexicana de Fitopatología 31: 60-64.

Resumen. En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) durante el período enero-2008 enero-2010, se evaluó la influencia del empleo de estacas procedentes de tallos primarios o secundarios en clones de porte moderadamente ramificados de yuca (*Manihot esculenta*), sobre la incidencia y severidad de las pudriciones radicales, para lo que se emplearon los clones 'INIVIT Y-93-4' y 'CEMSA 74-6329'. En ambos casos en el momento de la cosecha se evaluó el peso de raíces comerciales por planta y el porcentaje de distribución e infección (severidad) de las pudriciones radicales. Como resultado se evidenció estadísticamente, que es posible emplear ramas secundarias de clones moderadamente ramificados, para reducir el porcentaje de infección de las pudriciones radicales. La selección de semilla produjo una marcada reducción en esta variable.

Palabras claves adicionales: material de plantación, prácticas agrícolas, podredumbres.

En Cuba las pudriciones radicales en yuca constituyen uno de los principales factores limitantes de la producción en la actualidad, situación que resulta favorecida fundamentalmente por los excesos de lluvia durante la temporada ciclónica o de intensas lluvias, así como por prácticas inadecuadas de manejo del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2000a). El conocimiento de prácticas culturales como: tamaño, posición, procedencia, profundidad de plantación de las estacas, selección óptima, densidad, época de plantación, tiempo de cosecha, entre otras, permiten asegurar el éxito de la explotación agrícola en yuca

Abstract. The influence of cuttings from primary or secondary stems of moderately branched clones on incidence and severity of root rot disease was tested at the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops, bananas, plantains and vegetables (INIVIT) during January/2008 to January/2010. Cassava clones 'INIVIT Y-93-4' and 'CEMSA 74-6329' were used. In both cases, commercial root weight per plant and distribution and infection percentage of root rots were assessed at harvesting time. As result, it was statistically shown that secondary branches from moderately branched clones can be used to reduce infection percentage of root rot. Seed selection resulted in a marked reduction in this variable.

Additional keywords: planting material, agricultural practices, root rot.

In Cuba, currently cassava root rots are one of the main limiting factors of production, a situation that is favored mainly by excessive rainfall during the hurricane or heavy rains season, as well as from poor crop management (Rodríguez *et al.*, 2000a). Knowledge of a range of cultural practices such as: size, position, origin and depth of cuttings plantation, optimal selection, density and planting time, harvest time, among others, allow ensuring success of the cassava farming (Arismendi, 2001). Therefore, the aim of this study was to correlate the incidence of these rots to the origin (source) of the cuttings used in the plantation.

During two years the following treatments were evaluated at INIVIT: cuttings from primary stem and cuttings from secondary stem (in both cases 'INIVIT Y-93-4' and 'CEMSA 74-6329' clones). Parcels with soil without inoculate were used and they had five rows of 9 m length and the planting distance was 0.90 x 1.00 m. The cuttings were placed in a horizontal position. At the time of harvest, the following parameters were evaluated: the weight of commercial roots per plant, the percentage of distribution

(Arismendi, 2001). Por esta razón la presente investigación tuvo como objetivo relacionar la incidencia de estas pudriciones con la procedencia de las estacas empleadas en la plantación.

Durante dos años se evaluaron en el INIVIT los siguientes tratamientos: estacas procedentes del tallo primario y de tallo secundario (en ambos casos clones 'INIVIT Y 93-4' y 'CEMSA 74-6329'). Se emplearon parcelas con suelo sin inocular que tenían cinco surcos de 9.00 m de largo, y la distancia de plantación fue de 0.90 x 1.00 m. Las estacas se colocaron en posición horizontal. En el momento de la cosecha se evaluó el peso de raíces comerciales por planta y el porcentaje de distribución e infección de las pudriciones radicales provocadas por hongos fitopatógenos habitantes del suelo (*Diplodia manihotis*, *Sclerotium rolfsii*, *Mucor mucedo*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Diplodia natalensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Geotrychum candidum* y *Phytophthora tropicalis*, según Folgueras *et al.* (2010)).

Se determinó el porcentaje de distribución de plantas afectadas, a través de la siguiente fórmula (Folgueras *et al.*, 2011):

$$P = n * 100 / N$$

Donde: P- Porcentaje de distribución; n- Número de plantas enfermas y N- Número de plantas evaluadas.

Para evaluar el porcentaje de infección o severidad se tuvo en cuenta la Escala de Daños descrita por Folgueras *et al.* (2011), donde: 0 = sin síntomas visibles, 1 = necrosamiento de brotes en estacas germinadas, 2 = necrosamiento de brotes tiernos y marchitez similar al estrés causado por la sequía, 3 = pudrición acuosa y blanda de la raíz con olor fétido, 4 = pudrición acuosa y blanda de la raíz con olor fétido y destrucción del sistema radicular. y 5 = pudrición interna del tocón sin síntomas en el follaje.

Los porcentajes de infección, se calcularon por la fórmula de Townsend y Heuberger en 1958, citada por Folgueras *et al.* (2011), modificada:

$$\text{Porcentaje de infección} = \frac{(ab)}{nk} 100$$

Donde: a- valores numéricos de las categorías de daños (índice de la escala), b- cantidad de plantas por categorías de daños, n- cantidad total de plantas evaluadas y K- grado máximo de la escala.

Se aplicó el ANOVA Bifactorial No Paramétrico según Sokal y Rohlf (1995), y la prueba utilizada estuvo en correspondencia con las variables a analizar. Para controlar la tasa de Error Tipo I por comparaciones y asegurar que el Error Global no excediera a 0.1, el nivel de clasificación (α) se tomó como un valor igual a 1 menos la raíz del número de comparaciones (c) de 1 menos 0.05, es decir: $\alpha = 1 - \sqrt[c]{1 - 0.05}$ (Sheskin, 2004).

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de distribución al emplear ramas secundarias o primarias en 2008 (Tabla 1). Los valores más bajos fueron 50.28 y 50.90 % cuando se

and root rot infection caused by pathogenic fungi living in the soil (*Diplodia manihotis*, *Sclerotium rolfsii*, *Mucor mucedo*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Diplodia natalensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Geotrychum candidum* and *Phytophthora* tropicales, according to Folgueras *et al.* (2010)).

The distribution percentage of plants affected was estimated by using the following formula (Folgueras *et al.*, 2011):

$$P = n * 100 / N$$

Where: P- distribution percentage, n-number of infected plants and N- Number of plants evaluated. To estimate the rate of infection or severity, the scale of damage described by Folgueras *et al.* (2011) was used, where: 0 = no visible symptoms, 1 = necrosis of buds in sprouted cuttings, 2 = necrosis of tender buds and wilting similar to the stress caused by drought, 3 = soft and watery root rot with foul odor, 4 = soft and watery root rot with foul odor. Destruction of the root system, and 5 = internal rot of the stump without symptoms in the foliage.

The infection percentages were calculated using the Townsend and Heuberger (1958) formula, cited by Folgueras *et al.* (2011), as amended:

$$\text{Porcentaje de infección} = \frac{(ab)}{nk} 100$$

Where: a- numerical values of the damage categories (index scale), b- number of plants by damage categories, n- total number of plants evaluated and K- maximum degree of the scale.

Non-parametric bifactorial ANOVA was applied according to Sokal and Rohlf (1995), and the test used was in correspondence with the variables to be analyzed. In order to control the Type I error rate by comparisons and make sure that the Global Error did not exceed 0.1, the classification level (α) was considered as a value equal to 1 minus the root of the number of comparisons (c) of 1 minus 0.05, i.e. $\alpha = 1 - \sqrt[c]{1 - 0.05}$ (Sheskin, 2004).

Statistically significant differences were detected between the distribution percentages when using secondary or primary branches in 2008 (Table 1). The lowest values were 50.28 and 50.90 % when secondary branches were used for 'INIVIT Y-93-4' and 'CEMSA 74-6329', respectively. In 2009 there were no differences from the statistical point of view for this analysis. Statistically significant differences were detected between the percentages of infection when using secondary or primary branches for both the years, 2008 and 2009. The lowest infection rates were achieved in 2009 with 4.31 and 3.31% for 'INIVIT Y-93-4' and 'CEMSA 74-6329', respectively, when secondary branches were used.

Comparisons (peer to peer) between treatments detected statistically significant differences between clones, regardless of using secondary or primary branches (Table 3). 'INIVIT Y-93-4' clone reached the highest yields (1.77 and 1.95 kg.plant⁻¹ in 2008 and 4.79 and 4.55 kg. plant⁻¹ in 2009),

Tabla 1. Comparación del porcentaje de distribución e infección al emplear diferentes tipos de ramas, mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis.

Table 1. Comparison of distribution percentage and infection rates when using different types of branches, using a Kruskal Wallis non parametric variance analysis.

Tratamientos	Porcentaje de distribución		Porcentaje de infección	
	Año 2008 Media	Año 2009 Media	Año 2008 Media	Año 2009 Media
'INIVIT Y-93-4' (Ramas primarias)	85,47 b	5,30 a	65,42 b	5,73 b
'INIVIT Y-93-4' (Ramas secundarias)	50,28 a	5,80 a	39,12 a	4,31 a
'CEMSA 74-6329' (Ramas primarias)	76,85 b	5,52 a	59,41 b	5,38 b
'CEMSA 74-6329' (Ramas secundarias)	50,90 a	4,19 a	38,34 a	3,31 a

Por columnas (a, b) medias con letras no comunes difieren (sign. 0,05).

emplearon ramas secundarias para 'INIVIT Y-93-4' y 'CEMSA 74-6329', respectivamente. En 2009 no se revelaron diferencias desde el punto de vista estadístico para este análisis. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de infección al emplear ramas secundarias o primarias tanto para el año 2008 como en el 2009. Los porcentajes de infección más bajos se alcanzaron en 2009 con 4.31 y 3.31% para 'INIVIT Y-93-4' y 'CEMSA 74-6329', respectivamente, cuando se emplearon ramas secundarias.

Se revelaron diferencias estadísticas en el rendimiento entre los clones 'INIVIT Y-93-4' y 'CEMSA 74-6329', mientras que el efecto del factor tipo de rama no fue estadísticamente significativo (Tabla 2).

Las comparaciones (par a par) entre los tratamientos, detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los clones, independientemente de emplear ramas secundarias o primarias (Tabla 3). El clon 'INIVIT Y-93-4' alcanzó los rendimientos más elevados (1.77 y 1.95 kg.planta⁻¹ en 2008 y 4.79 y 4.55 kg.planta⁻¹ en 2009), al emplear ramas primarias y secundarias, respectivamente.

Los clones evaluados en esta investigación son de porte moderadamente ramificado y producen de 3-4 ramificaciones, la altura de la primera de ellas, se produce aproximadamente, en el 'CEMSA 74-6329' a los 40-50 cm

when using primary and secondary branches, respectively.

The clones tested on this research are little ramifications sized and they produce 3 - 4 branches, the height of the first of them occurs approximately at 40-50 cm and at 50 - 60 cm in the 'CEMSA 74-6329' and 'INIVIT Y-93-4', respectively; and in both of them, the stem thickness is between 8-12 cm. According Dominguez *et al.* (1983) the time at which branches occur, and the factors that control it, are not fully determined.

Rodriguez (1987) stated that the selection of propagation material is very important to obtain acceptable results, even in the case of suitable genotypes in the behavior of this character.

Cassava branching is the transformation of the vegetative apex into a reproductive one. In the erect clones, the fifth or sixth primary stem section has approximately the same age as the first or second section of the first branch in a branched clone, because in the latter, branching occurs after two months, hence it can be recommended that the secondary branches can be used for planting, as long as the diameter of the medulla oscillates between 45 and 60 % of the total diameter of the cutting (Rodríguez, 1997, Rodríguez *et al.*, 2000b).

The results obtained regarding the percentage of plants with symptoms compared to total plants evaluated in

Tabla 2. Resultados del ANOVA bifactorial no paramétrico al evaluar los efectos del tipo de ramas (primarias o secundarias) y de los clones sobre el rendimiento.

Table 2. Non-parametric bifactorial ANOVA results when evaluating the effects of branch type (primary or secondary) and the clones on the yield.

Factores	Rendimiento (kg.planta ⁻¹)			
	Año 2008		Año 2009	
	H	Significación	H	Significación
Tipo de Ramas ^a	0,069	0,793 ns	0,044	0,834 ns
Clon ^b	11,294	0,001**	10,599	0,001**
Tipo de Ramas X Clon	0,003	0,958 ns	0,011	0,916 ns

^aEl factor tipo de ramas incluye a las ramas primarias y secundarias

^bEl Factor clon incluye a 'INIVIT-93-4' y 'CEMSA 74-6329'

*Diferencias significativas para p < 0,05

Tabla 3. Comparación del rendimiento (kg.planta⁻¹) al emplear diferentes tipos de ramas, mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis.

Table 3. Yield comparison (kg.plant⁻¹) when using different branch types, by analyzing with a Kruskal Wallis non parametric variance analysis.

Tratamientos	Rendimiento (kg.planta ⁻¹)	
	Año 2008 Media	Año 2009 Media
'INIVIT Y-93-4' (Ramas primarias)	1,77 a	4,79 a
'INIVIT Y-93-4' (Ramas secundarias)	1,95 a	4,55 a
'CEMSA 74-6329' (Ramas primarias)	0,39 b	2,61 b
'CEMSA 74-6329' (Ramas secundarias)	0,48 b	2,35 b

Por columnas (a, b) medias con letras no ocunnes difieren (sign. 0,05).

y en el 'INIVIT Y-93-4' a los 50-60 cm y en ambos, el grosor del tallo es de 8-12 cm. Según Domínguez, *et al.* (1983), el momento en el cual se producen estas ramificaciones y los factores que lo controlan, no están totalmente determinados.

Rodríguez (1987) afirmó que la selección del material de propagación tiene gran importancia para la obtención de resultados aceptables, aún cuando se trate de genotipos idóneos en el comportamiento de éste carácter.

La ramificación en yuca es la transformación del ápice vegetativo en reproductivo. En los clones de porte erecto la quinta o sexta sección del tallo primario, tienen aproximadamente la misma edad, que la primera o segunda sección de la primera ramificación en un clon ramificado, pues en este último, la ramificación se produce después de los dos meses, de ahí que se puede recomendar que las ramas secundarias sean utilizables para la plantación, siempre que cumplan la condición de que el diámetro de la médula oscile entre el 45 y 60 % del diámetro total de la estaca (Rodríguez, 1997; Rodríguez *et al.*, 2000b).

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de plantas con síntomas respecto al total de plantas evaluadas en 2009, estuvieron influenciados por la selección de la semilla, que fue realizada al concluir el propio experimento en 2008 y para efectuar la plantación en el ciclo siguiente, pues como se apreció, se produjo una marcada reducción en esta variable en el segundo año, cuyos valores no reflejan diferencias estadísticamente significativas.

Resultó evidente que el tipo de rama empleada ejerció influencia sobre el desarrollo de la enfermedad, independientemente del clon utilizado. Esto corrobora la afirmación de numerosos autores (Lozano, 1992; Lozano y Nolt, 1994; IICA, 2007), insisten que las pudriciones radicales de yuca se transmiten por el uso de estacas enfermas, de ahí la importancia de usar semilla sana para la plantación. Álvarez *et al.* (2002), aseguran que la selección de plantas vigorosas y sanas para ser usadas como semillas, es una forma de control para la enfermedad en yuca.

El hecho de que no se manifestaran diferencias estadísticas en el rendimiento entre los tratamientos evaluados, se debió a que el porcentaje de infección en las ramas primarias fue superior al de las secundarias, se eliminaron mayor cantidad de raíces podridas, lo que provocó que el rendimiento se redujera y prácticamente se

2009, were influenced by selection of the seed that was made at the end of the experiment itself in 2008 and to carry out planting in the next cycle because, as it was noted, there was a marked reduction in this variable during the second year, whose values did not reflect statistically significant differences.

It was evident that the branch type used, influenced the disease development regardless of the clone used. This corroborates many authors claim (Lozano, 1992; Lozano and Nolt 1994, IICA, 2007) who insist that the cassava root rots are transmitted because of the use of diseased cuttings and hence the importance of using healthy seed for planting. Álvarez *et al.* (2002) affirm that the selection of vigorous and healthy plants to be used as seeds is a form to control the disease in cassava.

The fact that there were not statistical differences on the yield between treatments evaluated, was due to the fact that percentage of infection in the primary branches was higher than in the secondary ones, thus many rotten roots were eliminated causing the yield to be reduced and almost equalized.

CONCLUSIONS

The use of secondary branches reduced the percentage of root rot infection between 25 and 39 %; therefore, it is possible to use them in the moderately branched clones to reduce the percentage of severity. The seed selection produced a marked reduction in this variable during the second year.

LITERATURA CITADA

- Álvarez E, Loke J, Rivera S y Llano G. 2002. Genética de la resistencia a pudrición causada por *Phytophthora tropicalis* en dos poblaciones segregantes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Fitopatología Colombiana Vol. 26 : 61-65.
- Arismendi LA. 2001. Investigación sobre el cultivo de la yuca en el Oriente de Venezuela. Revista UDO Agrícola 1: 1-10.
- Domínguez C, Ceballos LF y Fuente C. 1983. Morfología de la planta de yuca. Pág. 29-49. In: Domínguez CE. (eds). Yuca: Investigación, Producción y Utilización. Colombia, 660 p.

igualara.

CONCLUSIONES

El empleo de ramas secundarias redujo los porcentajes de infección de las pudriciones radicales entre 25 y 39 %, de modo que es posible emplearlas en los clones moderadamente ramificados, para reducir el porcentaje de severidad. La selección de la semilla produjo una marcada reducción en esta variable en el segundo año.

- Folgueras M, Rodríguez S, Herrera L y Sánchez S. 2011. Influencia de diferentes métodos de plantación en la incidencia de las pudriciones radicales de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista Cuadernos de Fitopatología 28: 23-27.
- Folgueras M, Rodríguez S y Herrera L. 2010. Prácticas para el manejo agroecológico de las pudriciones radicales de la yuca. Revista Agricultura Orgánica 16: 24-25.
- IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2007. Manejo Integrado de Enfermedades del Cultivo de Yuca. CAF. Territorios Rurales. Observatorio Territorios Rurales, Síntesis de Experiencias Locales, No. 90. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia, 4p.
- Lozano JC and Nolt B. 1994. Diseases of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 344 p.

- Lozano JC. 1992. Overview of integrated control of cassava disease. Fitopatología Brasileira 17:18-22.
- Rodríguez S. 1987. Interacción Genotipo-Ambiente, clasificación de ambientes y uso de diferentes métodos de estabilidad en yuca (*M. esculenta* Crantz). 143pp. Tesis (Candidato a Doctor en Ciencias Agrícolas). Instituto Superior de Ciencias Agrícolas de La Habana, Cuba.
- Rodríguez S. 1997. Estrategia de las raíces y tubérculos tropicales en Cuba. I Encuentro Nacional de Productores de Viandas efectuado en el INIVIT. Santo Domingo, Cuba: INIVIT, 1997. Pág. 2-6.
- Rodríguez S, Folgueras M, Medero V y García M. 2000a. La Yuca en Cuba. Continente Yuquero. 2: 5-6.
- Rodríguez S, Folgueras M, Medero V, García M, Pons C, González DL y Molina O. 2000b. Desarrollo del cultivo de la yuca (*M. esculenta* Crantz) en Cuba. Reunión Anual del Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca, CLAYUCA. Cali, Colombia, Pág. 26-39.
- Sheskin D. 2004. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 3rd Ed. Western Connecticut State University, Danbury, Connecticut, USA. Eds. CHAPMAN & HALUCRC, 1184 p.
- Sokal RR and Rohlf FJ. 1995. Biometry, Third Edition, W. H. Freeman and Company, New York, USA. 887 p.

Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*)

Effect of the Azoxystrobin on *Moniliophthora roreri*, Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa (*Theobroma cacao*)

Magdiel Torres de la Cruz, División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5. CP 86039, México; **Carlos Fredy Ortiz García**, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. km. 3.5 Carretera Cárdenas-Huimanguillo, H. Cárdenas, Tabasco, CP 86500, México; **Daniel Téliz Ortiz, Antonio Mora Aguilera y Cristian Nava Díaz**, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. Correspondencia: cfortizg@gmail.com

(Recibido: Diciembre 10, 2010 Aceptado: Abril 24, 2011)

Torres de la Cruz M, Ortiz García CF, Téliz Ortiz D, Mora Aguilera A y Nava Díaz C. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). Revista Mexicana de Fitopatología 31:65-69.

Resumen. El hongo *Moniliophthora roreri*, causante de la moniliasis, es la principal limitante parasítica de la producción de cacao en Tabasco, México. El fungicida azoxystrobin se evaluó como agente curativo de *M. roreri*, en Tabasco. *In vitro*, azoxystrobin inhibió el 100 % de la germinación de conidios a una concentración de 450 mg L⁻¹ y el 96 % del crecimiento micelial con una concentración de 1250 mg L⁻¹. La concentración efectiva 95 (CE₉₅) para la germinación y el crecimiento micelial fue de 138 y 120 mg L⁻¹, respectivamente. Frutos tratados en campo con azoxystrobin a 1250 mg L⁻¹ resultaron con una mortalidad del 42 % comparado con 94 % en frutos sin tratamiento. La efectividad terapéutica del azoxystrobin fue de 55 % en frutos juveniles de hasta 10 cm de longitud, infectados naturalmente y con síntomas de *jiba* o hinchamientos. Los frutos tratados, alcanzaron madurez, con desarreglo y disminución en el número de granos. Este es el primer reporte de la acción curativa de un fungicida sobre *Moniliophthora roreri* y muestra que el azoxystrobin puede ser incorporado en programas de manejo integrado de la enfermedad y del cultivo.

Palabras claves adicionales: Frosty pod rot, estrobirulinas, control químico, efecto terapéutico.

Moniliophthora roreri es el agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Se originó en el noreste de Colombia y es una de las enfermedades más destructivas en los principales países americanos productores de cacao. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en Colombia en 1817; cien años más tarde se reportó en Ecuador en 1917, y en 2005 en

Abstract. The fungus *Moniliophthora roreri*, causal agent of frosty pod rot, is the main limiting disease of cocoa (*Theobroma cacao*) production in Tabasco, México. The fungicide azoxystrobin was assessed as a healing agent of *M. roreri*. *In vitro*, azoxystrobin at 450 mg L⁻¹ inhibited 100 % of the conidial germination and 96 % of mycelium growth at 1250 mg L⁻¹. The effective concentration 95 (EC₉₅) for germination and micelial growth was 138 y 1203 mg L⁻¹, respectively. Azoxystrobin at 1250 mg L⁻¹, *in vivo*, reduced fruit rot to 42 % compared with 94 % in untreated fruits. The therapeutic effectiveness of azoxystrobin was 55 % in young fruits, up to 10 cm long, naturally infected and with symptoms of swellings. The treated fruits reached an irregular maturity with fewer seeds. This is the first report of the curative action of a fungicide on *Moniliophthora roreri*, and indicates the possible incorporation of azoxystrobin in integrated disease and crop management programs.

Additional keywords: Moniliasis, strobirulins, chemical control, curative effect.

Moniliophthora roreri is the causative agent of cocoa frosty pod rot disease (*Theobroma cacao*) (Phillips-Mora and Wilkinson, 2007). This disease originated in northeastern Colombia and is one of the most destructive diseases in major cocoa producing american countries. It was first detected in Colombia in 1817; hundred years later it was reported in Ecuador in 1917, and in 2005 in Mexico (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora and Wilkinson, 2007). Currently, *M. roreri* is the main parasitic limitation of cocoa crop in Mexico with losses exceeding 75% of annual production (Torres-de la Cruz *et al.*, 2011). Cultural practices have been the most common method for controlling frosty pod rot of cocoa, and the use of fungicides has been a practice rarely used due to poor results (Evans, 1981) and the fluctuating price of cocoa that make unaffordable the applications; however, the selection of appropriate fungicides against *M. roreri* could give

México (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Actualmente *M. royeri* es la principal limitante parasítica del cultivo del cacao en México, con pérdidas que superan el 75% de la producción anual (Torres-de la Cruz *et al.*, 2011). Las prácticas culturales han sido el método más aplicado para el combate de la moniliasis del cacao, y el uso de fungicidas ha sido una práctica poco empleada, debido a erráticos resultados (Evans, 1981) y al precio fluctuante del cacao que hacen incosteable la aplicación; sin embargo, la selección de fungicidas adecuados contra *M. royeri* podría dar resultados favorables en plantaciones de alto rendimiento (Murillo y González, 1984). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el azoxystrobin como agente curativo de *M. royeri*, en Tabasco, México, bajo la hipótesis de que el azoxystrobin posee efecto erradicativo de *M. royeri* en infecciones tempranas (fase biotrófica) de frutos juveniles (*chilillo*), recuperándolos de la infección y permitiendo la formación de frutos comerciales.

La cepa de *M. royeri* se aisló de frutos de cacao en estado inicial de necrosis externa (Evans, 1981) procedentes del estado de Tabasco. El azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Suiza) se evaluó *in vitro* sobre la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *M. royeri* a concentraciones de 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1250 mg L⁻¹ (tratamientos) en medio PDA (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (Zavala-León *et al.*, 2005), con cinco repeticiones por tratamiento. La germinación (%) se determinó con base en la lectura de 100 conidios por repetición y tratamiento, y las lecturas se realizaron cada 24 h hasta las 144 h, tiempo en que el testigo (sin fungicida) superó el 90 % de germinación. El crecimiento micelial, medido (cm) en dos ejes (horizontal y vertical), se evaluó cada 24 h con ayuda de un vernier digital (Trupper®, México). Las mediciones terminaron a los dieciséis días, tiempo en que el testigo (sin fungicida) llenó la caja. *In vivo*, el azoxystrobin se evaluó sobre frutos de cacao de uno a dos meses de edad, infectados naturalmente por *M. royeri* con hinchamientos superficiales (*jibas* pequeñas). Los frutos fueron marcados y la mortalidad se cuantificó semanalmente. Los tratamientos (azoxystrobin a 0 y 1250 mg L⁻¹ en dilución acuosa) se evaluaron bajo un diseño completamente al azar repetido dos veces en el tiempo (dos ciclos reproductivos). Cada unidad experimental consistió en 100 frutos juveniles (*chilillos*) (de 8 hasta 10 cm de longitud), y el azoxystrobin se aplicó por aspersión con bomba de mochila dirigida únicamente al fruto juvenil una sola vez al inicio de cada ensayo. A 30 y 60 d después de la aplicación, todos los frutos fueron protegidos con hidróxido de cobre (1500 g.i.a. ha⁻¹) (Bateman *et al.*, 2005), para evitar infecciones posteriores. Los frutos que llegaron a madurez de consumo se abrieron longitudinalmente para documentar el arreglo de las semillas y los daños alcanzados por la enfermedad.

Los porcentajes de inhibición de la germinación y del crecimiento micelial *in vitro*, así como la efectividad del azoxystrobin en campo, se obtuvieron mediante la fórmula de Abbott (1925). Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual y

favorable results in high yield plantations (Murillo and González, 1984). Therefore, in the present study, azoxystrobin has been evaluated as a healing agent against *M. royeri* in Tabasco, Mexico, under the hypothesis that azoxystrobin has eradicated effect against *M. royeri* in early infections (biotrophic phase) of young fruits (*chilillo*), recovering them from infection and allowing the formation of commercial fruits.

The *M. royeri* strain was isolated from cocoa fruits of initial stages of external necrosis (Evans, 1981) from Tabasco State. Azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Switzerland) was evaluated *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of *M. royeri* at concentrations of 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 and 1250 mg L⁻¹ (treatments) on PDA medium (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (Zavala-León *et al.*, 2005), with five replicates per treatment. Germination (%) was estimated based on the reading of 100 conidia per replicate and treatment, and readings were taken every 24 h until completing 144 h, when the control (no fungicide) exceeded 90% germination. Mycelial growth measured (in cm) on two axes (horizontal and vertical), was assessed every 24h using a digital vernier (Trupper®, Mexico). The measurements ended after sixteen days when the control (no fungicide) filled the box. Azoxystrobin was evaluated on one to two months old cocoa fruits *in vivo* that were naturally infected by *M. royeri* with superficial swellings (small humps). The fruits were marked and the mortality was measured weekly. The treatments (azoxystrobin at 0 and 1250 mg L⁻¹ in aqueous dilution) were evaluated under a completely randomized design repeated twice in time (two reproductive cycles). Each experimental unit consisted of 100 young fruits (*chilillos*) (8 to 10 cm in length) and azoxystrobin was applied by knapsack spray directed only to young fruit once at the beginning of each trial and 30 and 60 days after application, all the fruits were protected with copper hydroxide (1500 g.i.a. ha⁻¹) to prevent further infections (Bateman *et al.*, 2005). The fruits that reached ripening were cut longitudinally to document the seeds arrangement and sickness damage.

The inhibition percentages of germination and mycelial growth *in vitro*, as well as the effectiveness of azoxystrobin in the field, were obtained by using Abbott's formula (1925). The data were transformed to the arcsine of the square root of the percentage value and subjected to variance analysis and mean separation test (Tukey, P = 0.05) using SAS (1998). From inhibition percentages obtained *in vitro*, the effective concentration 95 (EC₉₅) was estimated using Solver (Excel® Microsoft®).

Azoxystrobin at 450 mg L⁻¹ inhibited 100 % of the germination of conidia (Table 1) and its EC₉₅ was 138 ppm. In the absence of fungicide, the average germination was 97 % after 144 h. Mycelial development of *M. royeri* was inhibited by 90 % at all concentrations tested (Table 1); the highest inhibition (96 %) was obtained with 1250 mg L⁻¹ dose with an EC₉₅ of 1203 mg L⁻¹. This product has shown *in vitro* effectiveness on germination and mycelial growth of *Alternaria alternata* in apples (Reuveni and Sheglov, 2002), and on *Colletotrichum gleosporioides* in papaya and

sometidos a un análisis de varianza y prueba de separación de medias (Tukey; $P < 0.05$) mediante SAS (1998). De los porcentajes de inhibición obtenidos *in vitro*, se estimó la concentración efectiva 95 (CE_{95}) mediante Solver (Excel® Microsoft®).

El azoxystrobin a 450 mg L^{-1} inhibió el 100 % de la germinación de conidios (Cuadro 1) y su CE_{95} fue de 138 ppm. En ausencia del fungicida, la germinación promedio fue 97 % después de las 144 h. El desarrollo micelial de *M. roreri* fue inhibido en 90 % a todas las concentraciones evaluadas (Cuadro 1); la mayor inhibición (96 %) se obtuvo con la dosis de 1250 mg L^{-1} con una CE_{95} de 1203 mg L^{-1} . Este producto ha mostrado efectividad *in vitro* sobre la germinación y desarrollo micelial de *Alternaria alternata* en manzana (Reuveni y Sheglov, 2002), y *Colletotrichum gleosporioides* en papaya y mango (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004; Zavala-León *et al.*, 2005). Así también ha mostrado efectividad en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano y plátano (Pérez, *et al.*, 2002).

mango (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004; Zavala-León *et al.*, 2005). It has also shown effectiveness in controlling black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) in banana and plantain (Pérez, *et al.*, 2002).

In vivo, azoxystrobin at 1250 mg L^{-1} showed the lowest fruit mortality (42 %) with therapeutic efficiency of 55 %, while 94 % of the control fruits (without fungicide) died. The results allow to corroborate the azoxystrobin therapeutic effects because it was applied on diseased fruits (2 months old, in early phase of infection) and 51% of them recovered from the infection (Figure 1). The treated diseased fruits that reached ripening showed decrease in the number of seeds and fails in their development, similar to those observed by Evans (1981) in fruits infected by *M. roreri* in *chilillo* stage. Azoxystrobin showed translaminar activity which confers the ability to be absorbed and distributed into the tissue locally. It inhibits mitochondrial respiration by blocking the transfer of electrons to cytochromebc₁ complex (Bartlett *et al.*, 2002), and therefore, the ATP formation. This may explain the

Cuadro 1. Efecto del azoxystrobin sobre la germinación de conidios y el desarrollo micelial *in vitro* de *Moniliophthora roreri* aislado de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México.

Table 1. Effect of azoxystrobin on conidial germination and mycelial growth *in vitro* of *Moniliophthora roreri* isolated from cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico.

Tratamientos	Germinación Eficacia Abbott ^y (% inhibición)		Desarrollo Micelial Eficacia Abbott ^y (% inhibición)	
Testigo	----	----	----	----
Azoxystrobin 150 mg L^{-1}	95.4 ± 0.6	c	90.2 ± 0.5	d
Azoxystrobin 300 mg L^{-1}	98.9	b	90.5 ± 0.3	d
Azoxystrobin 450 mg L^{-1}	100	a	90.4 ± 0.4	d
Azoxystrobin 600 mg L^{-1}	100	a	90.5 ± 0.4	d
Azoxystrobin 750 mg L^{-1}	100	a	91.3 ± 0.2	c
Azoxystrobin 900 mg L^{-1}	100	a	92 ± 0.3	c
Azoxystrobin 1050 mg L^{-1}	100	a	93.3 ± 0.2	b
Azoxystrobin 1250 mg L^{-1}	100	a	95.6 ± 0.4	a

^yMedida con letras iguales dentro de la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$)

^zValores no calculados debido a la naturaleza de la fórmula de Abbott.

In vivo, el azoxystrobin a 1250 mg L^{-1} mostró la menor mortalidad de frutos (42 %) con una eficiencia terapéutica del 55 %, mientras que el 94 % de los frutos testigo (sin fungicida) murieron. Los resultados permiten deducir el efecto terapéutico del azoxystrobin ya que se aplicó en frutos enfermos (2 meses de edad, en etapa temprana de infección) y el 51 % se recuperaron de la infección (Figura 1). Los frutos enfermos tratados que alcanzaron la madurez de consumo presentaron disminución en el número de semillas y fallas en el desarrollo de las mismas, semejante a lo observado por Evans (1981) en frutos infectados por *M. roreri* en etapa de *chilillo*. El azoxystrobin presenta actividad translaminar que le confiere la capacidad de ser absorbido y distribuido

effectiveaction of this fungicide on *M. roreri* growth suppression inside the fruit in early development stages (*chilillos*). The suppressive effect of mycelial growth within the host tissue is an important objective in the management of diseases (Reuveniand Sheglov, 2002). This is the first report of the healing action of a fungicide against *M. roreri*, and azoxystrobin joins other effective fungicides against *M. roreri* such as flutolanil and copper hydroxide (Hidalgo *et al.*, 2003; Bateman *et al.*, 2005).

LITERATURA CITADA

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18:256-267.

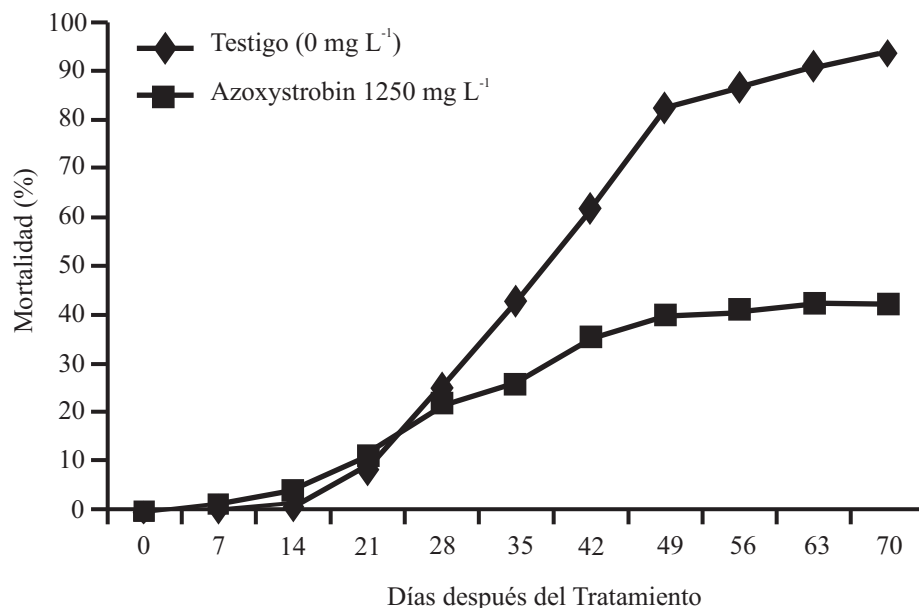


Figura 1. Efecto del azoxystrobin sobre el porcentaje (%) de frutos de cacao (*Theobroma cacao*) infectados por *Moniliophthora roreri* en Tabasco, México.

Figure 1. Effect of azoxystrobin on the percentage (%) of cacao fruit (*Theobroma cacao*) infected by *Moniliophthora roreri* in Tabasco, Mexico.

localmente dentro del tejido. Inhibe la respiración mitocondrial al bloquear la transferencia de electrones al complejo citocromo bc, (Bartlett *et al.*, 2002), y por lo tanto la formación de ATP. Esto puede explicar la efectiva acción de este fungicida sobre la supresión del crecimiento de *M. roreri* dentro del fruto en etapa temprana de desarrollo (*chilillos*). El efecto supresivo del crecimiento micelial dentro del tejido del hospedero es un objetivo importante en el manejo de enfermedades (Reuveni y Sheglov, 2002). Este es el primer reporte de la acción curativa de un fungicida sobre *M. roreri*, y el azoxystrobin se suma a otros fungicidas efectivos contra *M. roreri* como son el flutolanil e hidróxido de cobre (Hidalgo *et al.*, 2003; Bateman *et al.*, 2005).

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58:649-662.

Bateman RP, Hidalgo E, García J, Arroyo C, ten Hoopen GM, Adonijah V and Krauss U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 147:129-138.

Evans HC. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers* 24:1-44.

Gutiérrez AJG, Gutiérrez AO, Nieto AD, Téliz OD, Zavaleta ME y Delgadillo SF. 2004. Manejo integrado de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del mango (*Mangifera indica* L) durante

la postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:395-402.

Hidalgo E, Bateman RP, Krauss U, ten Hoopen M and Martínez A. 2003. A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology* 109:953-961.

Murillo D y González LC. 1984. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la moniliasis del cacao. *Agronomía Costarricense* 8:83-89.

Pérez L, Hernández A, Hernández L and Pérez M. 2002. Effect of trioxystrobin and azoxystrobin on the control of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop Protection* 21:17-23.

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* 55:584.

Phillips MW and Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647.

Reuveni M and Sheglov D. 2002. Effects of azoxystrobin, difeconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection* 21:951-955.

SAS Institute Inc. 1998. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Ed. SAS Institute INC. Cary, NC. USA. 1028 p.

Torres de la CM, Ortiz GCF, Téliz OD, Mora AA and Nava DC. 2011. Temporal progress and integrated

management of frosty pod rot [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.*] of cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93:31-36.
Zavala LMJ, Tun SJM, Cristóbal AJ, Ruíz SE, Gutiérrez AO, Vázquez CM y Méndez GR. 2005. Control

postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11:251-255.

Primer Reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México

First Report of *Phakopsora arthuriana* on *Jatropha curcas* in Mexico

Vicente Nolasco Gúzman, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco, km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México; **Victoria Ayala Escobar**, **Juan Manuel Tovar Pedraza**, **Eréndira Guadalupe Ríos López**, Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, CP 56230, México. **Humberta Gloria Calyecac Cortero**, **Andrés Miranda Rangel**, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco, km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México. Correspondencia: jmtovar@colpos.mx

(Recibido: Octubre 30, 2012 Aceptado: Diciembre 17, 2012)

Nolasco Guzmán V, Ayala Escobar V, Tovar Pedraza JM, Ríos López EG, Calyecac Cordero HG y Miranda Rangel A. 2013. Primer reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México. Revista Mexicana de Fitopatología 31: 70-73.

Resumen. Durante 2011 y 2012, se observaron síntomas de roya de la hoja en plantas de *Jatropha curcas* en Puebla, México. Basados en características morfológicas, el agente causal se identificó como *Phakopsora arthuriana*. Además, se encontró a *Sphaerellopsis filum* parasitando naturalmente el 30% de los uredios de *P. arthuriana*.

Palabras clave adicionales: *Phakopsora jatrophiicola*, *Sphaerellopsis filum*, roya, biocombustible.

Jatropha curcas L. es un arbusto de la familia Euphorbiaceae, originario de México y Centroamérica, el cual ha sido identificado como una de las mejores alternativas a nivel mundial para la producción de biocombustible, debido a su amplia adaptabilidad a diversas condiciones agroclimáticas, ciclo corto y producción de aceite en elevada cantidad y alta calidad industrial (Fairless, 2007).

En el 2011, en México se reportó un total de 2,536 ha cultivadas con *J. curcas* con fines comerciales, las cuales se encuentran distribuidas en los estados de Yucatán (2,450 ha) y Quintana Roo (86 ha) (SAGARPA, 2012). Durante 2011 y 2012, en un huerto no comercial (120 plantas) de *J. curcas* establecido en Chicuasencuatla, municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, México, se observaron hojas con síntomas típicos de roya en una incidencia de 40-45%. Por lo que, el objetivo de este estudio fue identificar al agente causal de los síntomas de roya en plantas de *J. curcas* en Puebla, México.

Se realizaron tres muestreos dirigidos a plantas de *J.*

Abstract. During 2011 and 2012, rust symptoms were observed on *Jatropha curcas* leaves in Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, Mexico. Based on morphological characteristics, the causal agent was identified as *Phakopsora arthuriana*. Additionally, *Sphaerellopsis filum* was found naturally parasiting 30% of *P. arthuriana* uredinia.

Additional keywords: *Phakopsora jatrophiicola*, *Sphaerellopsis filum*, rust, biofuel.

Jatropha curcas L. is a shrub of the Euphorbiaceae family, native to Mexico and Central America, which is one of the best worldwide alternatives for biofuel production because of its wide adaptability to various agro-climatic conditions, and oil production in large quantity and high industrial quality (Fairless, 2007).

In 2011, Mexico reported a total of 2,536 ha cultivated with *J. curcas* for commercial purposes which are distributed in Yucatan (2,450 ha) and Quintana Roo (86 ha) states (SAGARPA, 2012). During 2011 and 2012, in a noncommercial field (120 plants) of *J. curcas* located in Chicuasencuatla in the municipality of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, Mexico, leaves with typical symptoms of rust were observed with an incidence of 40-45%. Therefore, the aim of this study was to identify the causal agent of leaf rust symptoms in *J. curcas* plants in Puebla, Mexico.

During fall 2011 and 2012, three samplings were done specifically for *J. curcas* plant leaves with typical symptoms of rust. Leaves collected in the field were pressed to facilitate handling in subsequent studies. Symptoms in the abaxial surface of the leaves were reddish brown erumpent pustules (uredinia) to dark brown (telia) (Figure 1A-B); while in the adaxial surface initially only yellowish-brown spots irregularly shaped were observed, which became necrotic. In plants with severe infections, total

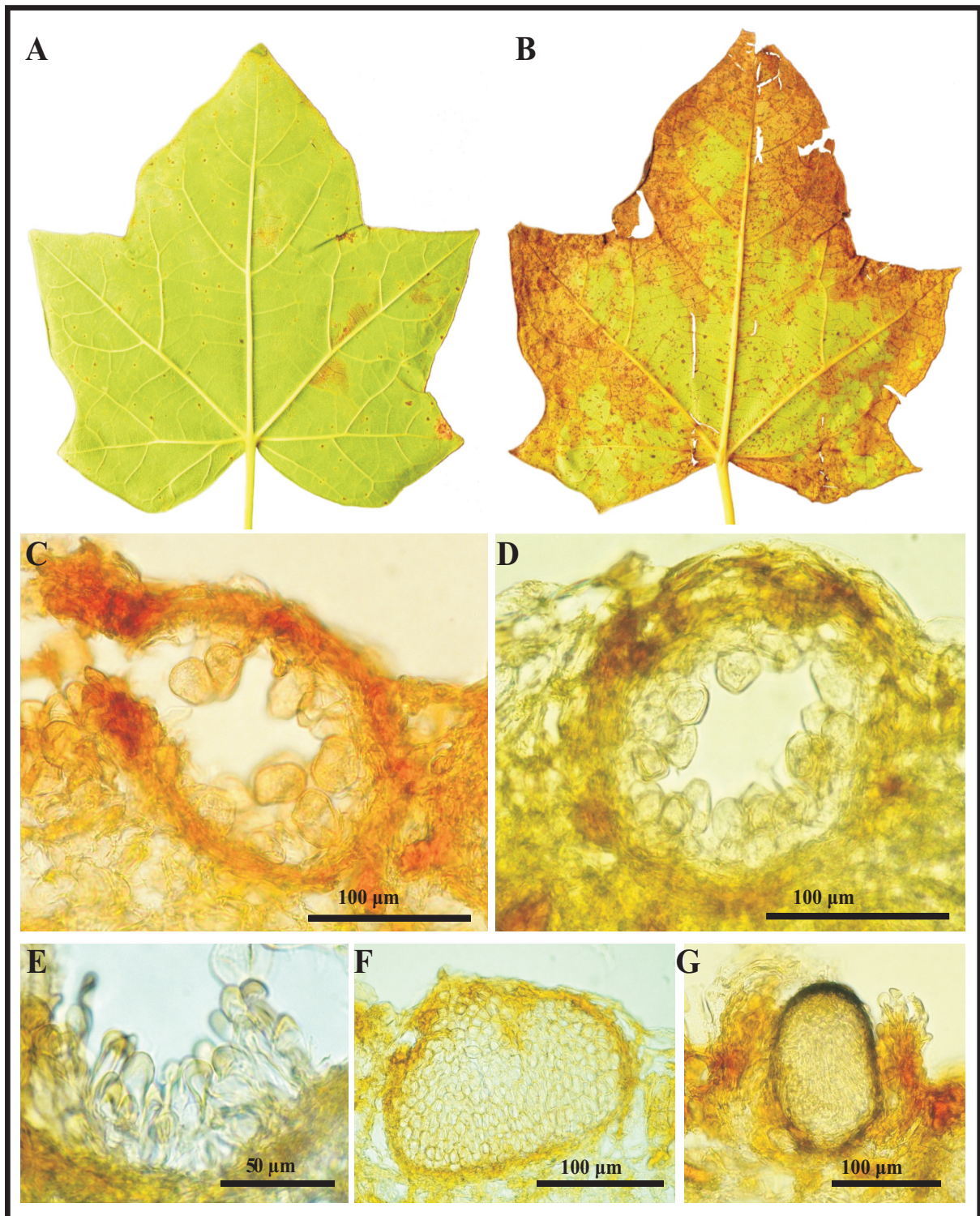


Figura 1. Síntomas y signos de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas*. (A) Síntomas iniciales en superficie abaxial de una hoja. (B) Síntomas severos en superficie abaxial de una hoja, mostrando necrosis y abundantes uredios. (C-D) Uredios con urediniosporas. (E) Paráfisis uredinales. (F) Telio con teliosporas. (G) Picnidio de *Sphaerellopsis filum* en cavidad uredinial.
 Figure 1. Symptoms and signs of *Phakopsora arthuriana* in *Jatropha curcas*. (A) Initial symptoms in abaxial surface of a leaf. (B) Severe symptoms in abaxial surface of a leaf, showing necrosis and abundant uredinia. (C-D) Uredinia with urediniospores. (E) Uredinial paraphyses. (F) Telia with teliospores. (G) *Sphaerellopsis filum* pycnidium in uredinial cavity.

curcas con síntomas típicos de roya en hojas durante el 2011 y 2012. Las hojas colectadas en campo se prensaron para facilitar su manipulación en estudios posteriores. Los síntomas en la superficie abaxial de las hojas fueron pústulas erupentes de color café-rojizo (uredios) a café oscuro (telios) (Figura 1A-B), mientras que, en la superficie adaxial se observaron inicialmente manchas café-amarillentas de forma irregular, las cuales se tornaron necróticas. En plantas con infecciones severas se observó la defoliación total de la parte media inferior. Para la caracterización morfológica del hongo, se realizaron preparaciones semi-permanentes en glicerina con cortes longitudinales de las estructuras (uredios y telios) presentes en la superficie abaxial de las hojas. Mediante un análisis en microscopía de luz a una magnificación de 400 aumentos, se determinaron las características morfológicas cualitativas y cuantitativas de 20 uredios, 25 urediniosporas, 10 paráfisis uredinales, 20 telios y 25 teliosporas. La identificación del hongo a nivel de género se realizó con el uso de las claves especializadas de Cummins e Hiratsuka (2003), mientras que para la determinación de la especie se utilizaron las claves de Buriticá (1999).

Los resultados de la caracterización morfológica mostraron uredios subepidermales, errumpentes, elipsoidales, de 137-212 x 125-160 μm (Figura 1C-D); urediniosporas elipsoidales-obovoides, unicelulares, con color amarillo-anaranjado, sésiles, equinuladas, de 24-33 x 18-24 μm (Figura 1C-D). Paráfisis uredinales claviformes, aseptados, color amarillo claro, rectos o curvados, de 25-47 μm en longitud y de 7-10 μm de grosor en el ápice (Figura 1E). Telios subepidermales, no errumpentes, elipsoidales-ampuliformes, de 150-265 x 117-220 μm , y conteniendo de 8-12 capas de teliosporas (Figura 1F). Teliosporas cuboides-oblongas, unicelulares, subhialinas, sésiles, de 10.8-13.7 x 9.2-11.3 μm , y dispuestas irregularmente dentro del telio (Figura 1F). Los resultados anteriores coinciden con las características morfológicas de *Phakopsora arthuriana* Buriticá & J.F. Hennen (sin. *P. jatrophicola*) reportadas por Buriticá (1999), Gomes-Carneiro *et al.* (2009) y Kobayasti *et al.* (2011).

Phakopsora arthuriana se ha reportado previamente en distintas especies del género *Jatropha* en países de América como Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, EEUU, Panamá, Perú, Puerto Rico, República Dominicana y Venezuela (Buriticá, 1999). En Brasil, Gomes-Carneiro *et al.* (2009), Vieira-Junior *et al.* (2009) y Kobayasti *et al.* (2011) recientemente documentaron a *P. arthuriana* causando defoliación total del tercio inferior y parcial del tercio medio de plantas de *J. curcas* en huertos comerciales para la producción de biocombustible. En Baja California, México, Buriticá (1999) reportó a *P. arthuriana* en hojas de *Jatropha canescens* (Benth.) Müll. Arg, sin embargo, este es el primer reporte de *P. arthuriana* en *Jatropha curcas* en México.

La importancia fitosanitaria y económica de la roya en *J. curcas* en México, radica en los altos niveles de incidencia y severidad en los que puede presentarse cuando las condiciones ambientales son favorables tal y como se observó en Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, ya que este

defoliation of the bottom half was observed. For the morphological characterization of the fungus, semi-permanent preparations in glycerin were made with longitudinal sections of the structures (uredinia and telia) present in the abaxial surface of the leaves. The qualitative and quantitative morphological characteristics of 20 uredinia, 50 urediniospores, 10 uredinial paraphyses, 20 telia and 50 teliospores were done with a light microscopy analysis at 400X magnification. The identification of the fungus genus was done with the use of Cummins and Hiratsuka (2003) specialized identification keys, while for the determination of the species the Buriticá identification keys (1999) were used.

The results of the morphological characterization showed subepidermal uredinia, erumpent, ellipsoid, 137-212 x 125-160 μm (Figure 1C-D); urediniospores were obovoid-ellipsoid, unicellular, yellow-orange color, sessile, echinulate, 24-33 x 18-24 μm (Figure 1C-D). Uredinial paraphyses were claviform, aseptate, pale yellow, straight or curved, 25-47 μm length and 7-10 μm thickness at the apex (Figure 1E). Telia were subepidermal, non-erumpent, ellipsoid-ampulliform, of 150-265 x 117-220 μm and containing 8-12 teliospores layers (Figure 1F). Teliospores were cuboid-oblong, unicellular, sub-hialines, sessiles of 10.8-13.7 x 9.2-11.3 μm and irregularly arranged inside the telia (Figure 1F). These results coincide with the morphological characteristics of *Phakopsora arthuriana* Buriticá & JF Hennen (syn. *P. jatrophicola*) reported by Buriticá (1999), Gomes-Carneiro *et al.* (2009) and Kobayasti *et al.* (2011).

Phakopsora arthuriana has been previously reported in different species of *Jatropha* genus in several american countries (Buriticá, 1999). In Brazil, Gomes-Carneiro *et al.* (2009), Vieira-Junior *et al.* (2009) and Kobayasti *et al.* (2011) documented the presence of *P. arthuriana* causing total defoliation of the lower third and partial defoliation on the middle third of *J. curcas* plants in commercial orchards for biofuel production. In Baja California, Mexico, Buriticá (1999) reported the occurrence of *P. arthuriana* in *Jatropha canescens* (Benth.) Müll. Arg leaves; however, this is the first report of *P. arthuriana* in *Jatropha curcas* in Mexico.

The phytosanitary and economic importance of leaf rust in *J. curcas* in Mexico, lies in the high levels of incidence and severity in which it can occur when environmental conditions are favorable as observed in Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, as this location has a humid temperate climate with rainfall throughout the year, which favored the disease progress. However, it is important to note that *J. curcas* commercial orchards established in Mexico, are located in places where subhumid warm climate prevails with summer rains, so possibly the pathogen has not been established and reported in these production sites.

Little is known about *P. arthuriana* management in commercial orchards of *J. curcas*. In Brazil, it is recommended to keep the remaining infected leaf debris accumulated inside the orchard, in order to reduce the primary inoculum source (Vieira-Junior *et al.*, 2009), and it is suggested the application of systemic fungicides based on thiophanate-methyl + flutriafol, pyraclostrobin +

municipio presenta un clima templado húmedo con lluvias todo el año, el cual favoreció el progreso de la enfermedad. No obstante, es importante señalar que las huertas comerciales de *J. curcas* establecidas en México, se encuentran en lugares donde predominan diferentes condiciones (clima cálido subhúmedo con lluvias en verano), por lo cual posiblemente el patógeno no se ha establecido y reportado en estos sitios de producción.

Poco se conoce sobre el manejo de *P. arthuriana* en huertos comerciales de *J. curcas*. En Brasil, se recomienda evitar que los restos de hojas infectadas queden acumulados en el huerto, con la finalidad de disminuir la fuente de inóculo primario (Vieira-Junior *et al.*, 2009), además se sugiere la aplicación de fungicidas sistémicos a base de tiofanato-metil + fuatrilfol, pyraclostrobin + epixiconazol, los cuales se han reportado como efectivos para el control de este patógeno (Roese *et al.*, 2008).

Adicionalmente a la detección de *P. arthuriana*, se observó un 30 % de uredios de la roya parasitados por picnidios de *Sphaerellopsis filum* (Biv.) B. Sutton (syn. *Darluca filum*) (Figura 1G). Este hongo se ha reportado hiperparasitando de manera natural alrededor de 30 géneros de Uredinales, entre los que se encuentra el género *Phakopsora*. La efectividad de *S. filum* se basa en su habilidad para degradar uredios, lo cual detiene el microciclo de propagación de urediniosporas y evita el desarrollo de nuevas infecciones (Lieseback y Zaspel, 2005).

Este estudio confirmó la presencia de *P. arthuriana* en plantas de *J. curcas* en Puebla, México, sin embargo, se sugiere realizar estudios epidemiológicos, análisis de riesgo, además de evaluar diferentes estrategias de control para elaborar un programa de manejo integrado de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Buriticá CP. 1999. La familia Phakopsoracea en el Neotrópico III, géneros: *Batistopsora* y *Phakopsora*. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 23: 271-305.
- Cummins GB and Hiratsuka Y. 2003. Illustrated Genera of Rust Fungi. 3rd Edition. APS Press. St. Paul Minnesota, USA. 240p.
- Fairless D. 2007. Biofuel: The little shrub that could- maybe. Nature 449: 652-655.
- Gomes-Carneiro SMTP, Medeiros-Ramos AL, Romano E, Marianowski T e Oliveira JP. 2009. Ocorrência de *Phakopsora jatrophiicola* em pinhão manso no estado do Paraná. Summa Phytopathologica 35:73.
- Kobayashi L, Da Silva RA e Santaella AG. 2011. Ocorrência de ferrugem (*Phakopsora arthuriana*) do pinhão manso em Mato Grosso. Revista de Ciências Agro-Ambientais 9: 307-312.

epoxiconazole, which have been reported as effective for the control of this pathogen (Roese *et al.*, 2008).

In addition to the *P. arthuriana* detection, it was observed a 30 % of rust uredinia parasitized by picnidia of *Sphaerellopsis filum* (Biv.) B. Sutton (syn. *Darluca filum*) (Figure 1G). This fungus has been reported naturally hyperparasitizing about 30 uredinales genus, among them the *Phakopsora* genus. The effectiveness of *S. filum* effectiveness is based on their ability to degrade uredinia, which stops the urediniospores propagation micro-cycle and prevents the development of new infections (Lieseback and Zaspel, 2005).

This study confirmed the occurrence of *P. arthuriana* in *J. curcas* plants in Puebla, Mexico; however, it is suggested that epidemiological studies and risk analysis should be done, besides testing various control strategies to develop a program of integrated disease management.

- Lieseback M and Zaspel I. 2005. Biology and genetic diversity of the rust hyperparasite *Sphaerellopsis filum* in Central Europe. pp. 231-241. In: Pei MH and McCracken AR (eds.). Rust Diseases of Willow and Polar. CABI Publishing, Wallingford, UK. 264 p.
- Roese AD, Silva CJ, Goulart ACP, e Abrão JS. 2008. Ocorrência da ferrugem no Pinhão-Manso, em Mato Grosso do Sul, e efeito de alguns fungicidas no controle da doença. Comunicado Técnico, 145. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, Brasil. 3p.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2011. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index (consulta, diciembre 2012).
- Vieira-Junior JR, Fernandes CF, Rocha RB, Ramalho AR, Marcolan AL, Guedes MLO, Reis ND e Silva DSG. 2009. Ocorrência da ferrugem (*Phakopsora jatrophiicola*) em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no Estado de Rondônia. Embrapa Rondônia 341: 1-4.

Revista Mexicana de Fitopatología (RMF)

Guía para Autores

Se aceptarán manuscritos en inglés o español de miembros y no miembros de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Los manuscritos podrán ser: Artículos científicos, revisiones, notas de investigación, descripción de variedades y cartas al editor. La publicación es bilingüe y sin costo de traducción. El comité editorial puede solicitar revisiones bibliográficas o contribuciones sobre temas específicos. Para su aceptación, los escritos deben tener las siguientes características:

- 1) Presentar un trabajo original sobre algún aspecto básico o aplicado de la fitopatología.
- 2) Puede ser artículo científico que precise un estudio concluido (repetido en tiempo y espacio), o artículo de revisión sobre hipótesis, teoría u otros temas fitopatológicos.
- 3) Notas fitopatológicas, incluyen originales sobre técnicas, observaciones, aspectos históricos de datos fitopatológicos. No contienen las secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 4) Descripción de variedades o híbridos vegetales, se basa en las características de material vegetativo que manifieste tolerancia o resistencia a enfermedades. No requiere secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 5) Cartas al editor, pueden ser opiniones concisas sobre trabajos fitopatológicos, principios, reseñas de libros o críticas. El comité editorial se reserva el derecho de publicar o rechazar este tipo de artículos.

La estructura de los manuscritos deberá apegarse a las normas editoriales de la revista, por lo que antes de enviarlo al editor se hará una revisión general preliminar, si no cumple con las normas se regresará al autor. El comité editorial de la RMF se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo, si no reúne los requisitos de calidad, consistencia y originalidad. Se acepta por anticipado que no han sido ni serán enviados a alguna otra revista.

GUÍA PARA EL FORMATO

Texto. Escriba en una forma clara y concisa. Use las palabras con precisión, claridad y economía. Cada oración debe ser exacta y simple. Describa las observaciones y los experimentos en tiempo pasado, use el presente para generalizaciones. Use oraciones directas y evite la voz pasiva; compare: "Las bacterias producen antibióticos" con "los antibióticos son producidos por bacterias". Evite los superlativos y palabras como: "muy", "mucho", "bastante", etc. También evite el uso de gerundios. Utilizar palabras cuando los números sean menores de 10 y sin estar asociados con medidas. Use las palabras técnicas con su significado preciso; acuda al diccionario especializado cuando haya duda. Se escriben en itálicas los nombres científicos y expresiones latinas como: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. Los nombres científicos de plantas o agentes fitopatógenos llevarán

Author's Guide

Manuscripts are accepted in English or Spanish from members and non-members of the Mexican Society of Phytopathological (SMF). Manuscripts may be: scientific articles, reviews, research notes, descriptions of varieties and letters to the editor. The publication is bilingual (English and Spanish) and without translation costs. The editorial board may request literature reviews or contributions on specific topics. For acceptance, the writings must have the following characteristics:

- 1) Submit an original work on some aspect of basic or applied plant pathology.
- 2) Can be a scientific paper that requires completed study (repeated in time and space), or review article on hypothesis, theory or other phytopathology topics.
- 3) Phytopathological notes include original techniques, observations and historical aspects of phytopathology data. They don't contain sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 4) Description of plant varieties or hybrids, it is based on the characteristics of plant material expressing tolerance or resistance to diseases. Does not require sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 5) Letters to the editor may be concise opinions on phytopathological studies, principles, book reviews or critics. The editorial board reserves the right to publish or reject such articles.

The structure of the manuscripts should adhere to the editorial standards of the journal, so before sending the publisher will make a preliminary overview, if you do not meet the standards will be returned to the author. The editorial board of the RMF reserves the right to refuse any work, if it does not meet the requirements of quality, consistency and originality. It is agreed in advance that they have not been and will not be sent to another journal.

FORMAT GUIDE

Text. Write clearly and concisely. Use words with precision, clarity and economy. Each sentence must be accurate and simple. Describe observations and experiments in the past tense, use the present tense to generalize. Use direct sentences and avoid the passive voice; compare: "The bacteria produce antibiotics" with "antibiotics are produced by bacteria". Avoid superlatives and words like "very", "many", "more", etc. Also avoid the use of gerunds. Use words when numbers are under 10 and not associated with measurements. Utilize technical words with their precise meaning; refer to a specialized dictionary when in doubt. Scientific names and phrases in Latin are written in italics, such as: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. The scientific names of plants or plant pathogens will have descriptor(s). When you finish writing the manuscript, study each sentence to determine whether

descriptor(es). Al terminar de escribir el manuscrito, estudie cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que en el manuscrito haya cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que el manuscrito haya sido revisado críticamente por sus colaboradores y por dos colegas. Adicionar carta de aprobación de los colaboradores.

Manuscritos. Los textos se escriben con letra Times New Roman, tamaño 12 y con márgenes de 2.5 cm en los cuatro lados. Para artículos científicos y de revisión, el manuscrito no deberá exceder de 20 páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras.

Cuadros: en tabla de Word (no enviar en imagen)

Gráficas: en Excel (no enviar en imagen)

Fotografías: mínimo con resolución de 300 dpi

Las notas fitopatológicas y la descripción de variedades no deberán exceder de siete páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras. El inicio de cada párrafo llevará sangría de 1 cm (excepto el primer párrafo introductorio). Incluya fotografías originales; si contiene gráficas, envíe los datos originales. Los manuscritos deben enviarse por correo electrónico a: **revmexfitopatologia@prodigy.net.mx** en Microsoft Word. La comunicación de los editores será exclusivamente con el autor de correspondencia. Los manuscritos que sean aceptados serán propiedad de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO

Título. El título debe identificar el contenido del tema; escriba títulos claros, concisos, específicos, no mayores de 15 palabras. Se debe escribir en mayúsculas y minúsculas, en negritas y centrado, evite iniciar con: "Investigación sobre...", "Estudios sobre...", etc. No se aceptarán títulos que indican una serie de trabajos relacionados, a menos que se envíen juntos. Los nombres científicos se escribirán en cursivas y sin incluir el (los) descriptor(es). En seguida del título en español se escribe el título en inglés.

Autor-institución. Abajo del título escriba el nombre completo de los autores con minúsculas, en negritas y justificado. Después de cada autor, escriba con minúsculas y sin negritas el nombre de la institución(es) correspondiente(s). Incluya el departamento, ciudad, estado y código postal, e indique el autor para correspondencia.

Ejemplo: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

Resumen. El encabezado deberá escribirse en letras

they can be shortened or omitted. Before sending, make sure that the manuscript has been critically reviewed by co-authors and two colleagues. Include letter of approval from co-authors.

Manuscripts. Texts are written in Times New Roman font, size 12 and with margins of 2.5 cm on all four sides. For scientific and revision articles, the manuscript should not exceed 20 pages written in one and a half space, including tables and figures.

tables: in Word table (do not send in picture)

graphics: in Excel (do not send in picture)

Photos: minimum resolution of 300 dpi

Phytopathological notes and descriptions of varieties should not exceed seven pages written in one and a half space including tables and figures. The beginning of each paragraph is to be indented 1 cm (except the first introductory paragraph). Include original photographs; if it contains graphs and/or charts, please send the original data. Manuscripts should be submitted by e-mail to revmexfitopatologia@prodigy.net.mx in Microsoft Word. Communication from the editors will be exclusively with the corresponding author. Accepted manuscripts will be property of the Mexican Society of Phytopathology. (Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.)

MANUSCRIPT ORGANIZATION

Title. The title should identify the content of the topic; write titles clear, concise, specific and no more than 15 words. It should be written in uppercase and lowercase letters, in bold and centered, avoid starting with: "Research on...", "Study about...", etc. Titles indicating a series of works will not be accepted, unless they are sent together. Scientific names will be written in italics and not including the descriptor(s). The title in English is written next to the title in Spanish.

Author-institution. Write the full names of the authors below the title, in lower case, bold and justified. After each author, write the name of the corresponding institution(s) in lower case and not in bold. Include the department, city, state, zip code, and indicate the corresponding author.

Example: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Department of Plant Genetic Engineering, Center for Research and Advanced Studies Irapuato Unit, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondence: zavaleta@colpos.mx.

Abstract. The header must be written in bold, lower case letters and aligned to the left. The abstract should summarize, in a single paragraph, the most important aspects of the research, without exceeding 200 words. Do not repeat the title in the abstract; use scientific nomenclature and avoid abbreviations.

negritas, minúsculas y a la izquierda. El resumen debe sintetizar, en un sólo párrafo, los aspectos más relevantes de la investigación, sin exceder más de 200 palabras. No repita el título en el texto del resumen; use la nomenclatura científica y evite las abreviaturas.

Palabras clave adicionales. Debe escribirse en letras minúsculas y a la izquierda. Abajo del resumen proporcione una lista de hasta seis palabras clave que sirvan para fines de compilación internacional, que no se incluyan en el título del trabajo.

Resumen. Esta sección debe escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. Proporcione una traducción fiel en inglés de lo escrito en el resumen en español.

Palabras claves adicionales. Debe escribirse en letras minúsculas y a la izquierda. Abajo del abstract proporcione una traducción fiel en inglés de la lista de las palabras señaladas en la sección de Palabras clave adicionales.

Los títulos de las secciones de Resultados, Discusión, Conclusiones y Literatura Citada, se escriben con mayúsculas, en negritas, en un solo renglón y a la izquierda de la hoja. Los subtítulos se escriben en minúsculas, en negritas y con punto y seguido.

INTRODUCCIÓN. Este encabezado se omite. La introducción incluye la descripción del problema. Justifique su investigación con referencias actuales y relevantes, y explique los objetivos del trabajo. La cita de referencias en el texto debe presentarse de la forma siguiente: Hasta dos autores, el apellido y año; más de dos autores, apellido del primer autor y *et al.*, seguido del año de publicación. El uso del paréntesis depende de la estructura general de la oración. Ejemplos: Un autor, Pfender (2010) o (Pfender, 2010); dos autores, Funnell y Pedersen (2009) o (Funnell y Pedersen, 2009); y tres o más autores, Angulo *et al.* (2009) o (Angulo *et al.*, 2009). Si el autor(es) y años son idénticos para más de una referencia, inserte una letra minúscula (en secuencia alfabética) después del año. Ejemplo: Ascencio *et al.* (2008a) o (Ascencio *et al.*, 2008b). Use punto y coma para separar varias referencias. Ejemplo: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS. En esta sección se describen los materiales y la metodología empleados con el detalle necesario, como para que otra persona pueda repetir exactamente el procedimiento. Se citará el lugar, fecha, tratamiento, método, diseño experimental, variables evaluadas, forma y época donde se obtuvieron los datos, análisis realizado, comparación de medias y programa estadístico. Cuando se trate de metodologías específicas, indique la referencia bibliográfica de donde se tomó, e indique las modificaciones pertinentes. Presente la información de una manera clara, ordenada y coherente. Use fotografías, cuadros y dibujos, solamente cuando ayuden a aclarar y documentar el texto. Las ilustraciones deben ser funcionales y no repetir el material descrito en el texto.

Additional key words. Must be written in lowercase letters and aligned to the left. Provide a list of up to six key words below the abstract, for the purpose of international compilation, that are not included in the title of the work.

Abstract. This section should be written in bold, lowercase letters and aligned to the left. Provide an accurate translation in Spanish of what was written in English in the Abstract section.

Additional keywords. Must be written in lowercase letters aligned to the left. Below the “Resumen” provide an accurate translation in Spanish of the key words list mentioned in the section Additional Key Words.

The titles of sections Results, Discussion, Conclusions, and Literature Cited, are written in capital, bold letters of no more than one line and aligned to the left of the page. Subtitles are written in lowercase, bold letters followed by a semicolon.

INTRODUCTION. This header is omitted. The introduction includes a description of the problem. Justify your research with current and relevant references, and explain the objectives of the work. The citation of references in the text should be presented in the following manner: Up to two authors, last name and year; more than two authors, last name of the first author and *et al.*, followed by the year published. The use of parenthesis depends on the general structure of the sentence.

Examples: One author, Pfender (2010) or (Pfender, 2010); two authors, Funnell and Pedersen (2009) or (Funnell and Pedersen, 2009); and two or more authors, Angulo *et al.* (2009) or (Angulo *et al.*, 2009). If the author(s) and year(s) are identical for more than one reference, insert a lower case letter (in alphabetical order) after the year. Example: Ascencio *et al.* (2008a) or (Ascencio *et al.*, 2008b). Use a semicolon to separate multiple references. Example: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

MATERIALS AND METHODS. This section describes the materials and methodology employed with the necessary detail, so that someone else can repeat the procedure exactly. Citing the location, date, treatment, method, experimental design, variables measured, manner and time where data were obtained, analysis carried out, comparison of means and statistical program. In the case of specific methodologies, indicate where the bibliographic reference was made, and indicate the necessary modifications. Present information in a clear, orderly and coherent manner. Use photographs, tables, graphs and drawings, only when they help to clarify and document the text. Illustrations must be functional and not repeat the material described in the text.

RESULTS. Present concise data on the main effects based on appropriate statistical methods. When you point out differences between two sets of results, mention the significance, do not identify trends. The discussion of the

RESULTADOS. Presente datos concisos sobre los principales efectos con base en métodos estadísticos apropiados. Cuando se señalen diferencias entre dos grupos de resultados, mencione la significancia, evite señalar tendencias. La discusión de los resultados se puede presentar bajo un encabezado separado; sin embargo, si el autor lo prefiere, ambos temas se pueden presentar bajo RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

DISCUSIÓN. Debe interpretar los resultados del trabajo y relacionarlos con investigaciones previas o con trabajos similares reportados en la literatura, incluir deducciones lógicas, no caer en especulaciones carentes de sustento, además, se pueden añadir sugerencias para estudios futuros.

CONCLUSIONES. En este apartado se anotarán de manera breve, sin numeración, las aportaciones concretas al conocimiento en función a los resultados obtenidos en el estudio.

Agradecimientos. El encabezado deberá escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. En esta sección se deberá expresar las gratitudes y reconocimientos de personas o instituciones. Puede mencionar la ayuda técnica, económica, o de cualquier otra naturaleza, así como si es parte de una tesis.

LITERATURA CITADA. Contendrá la lista de todas las citas mencionadas en el texto, las cuales se presentarán en orden alfabético y en sangría 'francesa'. Se debe incluir sólo trabajos publicados o en prensa, sometidos a procesos formales de arbitraje y edición, accesibles a través de bibliotecas o sistemas de información. No use "anónimo" como referencia, utilice las siglas y el nombre de la institución o fuente que publica la información. La estructura seguirá la secuencia siguiente:

1. Revistas científicas

- a) Autor(es). El apellido paterno seguido de las iniciales del apellido materno y nombre(s). Separe con una coma la última inicial del primer autor y siga con el apellido e iniciales de los coautores.
- b) Año de publicación.
- c) Título del trabajo. Sólo la primera letra de la primera palabra en un título en mayúsculas, a menos que se incluyan nombres propios.
- d) Nombre completo de la revista en que fue publicado el trabajo.
- e) Volumen y páginas.

Ejemplos: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*

results can be presented under a separate header; however, if the author prefers, both issues can be presented under RESULTS AND DISCUSSION.

DISCUSSION. Should interpret the results of the work and relate them to previous investigations or similar work reported in literature, include logical deductions, do not fall into unsubstantiated speculation, also, suggestions for future research can be added.

CONCLUSIONS. This section will contain concrete contributions to knowledge according to the results obtained in the study. They will be written briefly and without numbering.

Acknowledgements. The header must be written in bold, lowercase letters, aligned to the left. This section should express gratitude and appreciation of individuals or institutions. You may mention technical, economic or help of any nature, as if part of a thesis.

LITERATURE CITED. This will contain the list of all citations mentioned in the text, which will be presented in alphabetical order. It includes only works published or in press, subjected to formal processes of arbitration and editing, accessible through libraries or information systems. Do not use "anonymous" as a reference, use the initials and the name of the institution or source that published the information. The structure will have the following sequence:

1. Scientific Journals

- a) Author(s). Last name followed by the initial of mother's surname (if available) and first name(s). Separate with a comma the last initial of the first author and follow with the last names and initials of the co-authors.
- b) Year of publication.
- c) Title of the work. Only the first letter of the first word on the title in capitals, unless proper names are included.
- d) Full name of the journal that published the work.
- e) Volume and pages.

Examples: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:97-110.

2. Books

Author(s), year, title (capital and lowercase letters), edition, publisher, place of publication, and number of pages.

Examples: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.

28:97-110.

2. Libros

Autor(es), año, título (en mayúsculas y minúsculas), edición, casa editorial, lugar de publicación y el número de páginas. Ejemplos: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p. Rueda PJ. 2009. *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. Plaza y Valdés. México. 141p.

3. Capítulo de libro

Autor(es), año, título (minúsculas), páginas, editor(es), título del libro (mayúsculas y minúsculas), volumen, empresa editora, lugar de la publicación y número total de páginas.

Ejemplos: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible*. Plaza y Valdés. México. 255p.

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.

4. Folletos

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. *Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20*. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppla N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

5. Consultas en web

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8*. www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/ (consulta, junio 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. *Servicio de información agroalimentaria y pesquera*. www.siap.gob.mx/index (consulta, septiembre 2011).

Cuadros. Deben tener títulos entendibles sin necesidad de referirse al texto. Los cuadros deben documentar, pero no duplicar los datos que se presentan en el texto. Incluirlos de manera numerada, según el texto, en hojas separadas y a continuación de la literatura citada. La leyenda se escribe con minúsculas. Identifique las notas al pie de los cuadros con letras minúsculas del final del alfabeto (en secuencia: x, y, z). Para indicar niveles de significancia estadística, utilice asteriscos (*= p 0.05, **= p 0.01). En cifras usar solo un decimal, p. ej. 3.2% y no 3.195%.

Rueda PJ. 2009. *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. Plaza y Valdés. México. 141p.

3. Book chapter

Author(s), year, title (lowercase), pages, editor(s), title of the book (capital and lowercase letters), volume, publisher, place of publication and total number of pages.

Examples: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible*. Plaza y Valdés. México. 255p.

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.

4. Booklets

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. *Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20*. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppla N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

5. Web queries

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8*. www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/ (consulted, June 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. *Servicio de información agroalimentaria y pesquera*. www.siap.gob.mx/index (consulted, September 2011).

Tables. Titles should be understood without the need to refer to the text. Tables should document, but not duplicate the data presented in the text. Include them listed by number, according to the text, in separate pages, after the Literature Cited section. The legend is written in lowercase letters. Identify the notes at the bottom of the tables with lowercase letters starting with the last (in sequence: x, y, z). To indicate levels of statistical significance, use asterisks (*= p 0.05, **= p 0.01). Use only one digit after the decimal, for example 3.2% and not 3.195%.

Figures. Number each figure (graph, drawing, photograph, etc.) to match references in the text. Legends should be written in lowercase, in a separate page and attached after the tables. Photographs must be original and can be in black & white or color. Poor quality photographs will not be accepted. Do not write or draw arrows on original photos. Abbreviations and symbols used in the

Figuras. Numere cada figura (gráficas dibujos, fotografías, etc.) para que corresponda con la referencia del texto. Las leyendas se deben escribir en minúsculas, en una hoja por separado y anexarse a continuación de los cuadros. Las fotografías deben ser originales y pueden ser en blanco y negro o a color. No se aceptarán fotografías de mala calidad. No escriba o pegue flechas sobre las fotos originales. Las abreviaturas y símbolos usados en las figuras deben concordar con el mismo estilo usado en el texto. Cuando un conjunto de figuras son presentadas con una sola leyenda, los componentes se identificarán con letras mayúsculas del mismo tipo y tamaño.

Fertilizantes. Describa las dosis de fertilizantes en términos elementales (ejemplo: N, P, K, etc.). Si es necesario se puede señalar la fuente del fertilizante.

Plaguicidas. Use el nombre técnico (ingrediente activo) y concentración de los plaguicidas, el nombre comercial puede incluirse en paréntesis. Manuscritos sobre manejo de agroquímicos se considerarán siempre y cuando su contenido aporte nuevos conocimientos técnico-científicos.

Medidas. Se utilizará el sistema métrico decimal. Las abreviaturas serán en singular sin estar seguidas de punto. Las más comunes son:

Celsius = °C
 Centímetro = cm
 Día = d
 Gramo = g
 Hectárea = ha
 Hora = h
 Kilogramo = kg
 Kilogramos por hectárea = kg ha⁻¹
 Kilómetro = km
 Litro = L
 Metro = m
 Micron = µm
 Microlitro = µL
 Miligramo = mg
 Mililitro = mL
 Milímetro = mm
 Milimicra = mµ
 Minuto = min
 Nanómetro = nm
 Segundo = s
 Temperatura = temp
 Tonelada = t

Algunas referencias útiles para escribir artículos científicos en la RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.

Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub/1/.

figures should match the same style used in the text. When a set of figures are presented with a single legend, the components will be identified by capital letters of the same type and size.

Fertilizers. Describe the doses of fertilizers in terms of elements (e.g.: N, P, K, etc.). If necessary, the source of the fertilizer may be pointed out.

Pesticides. Use the technical name (active ingredient) and concentration of the pesticides, the commercial name may be included in parenthesis. Manuscripts on agricultural chemical management will be considered as long as the content provides new technical and scientific knowledge.

Measurements. The metric system will be used. The abbreviations will be in the singular form and will not be followed by a period. The most common are:

Celsius = °C
 Centimeter = cm
 Day = d
 Gram = g
 Hectare = ha
 Hour = h
 Kilogram = kg
 Kilograms per hectare = kg ha⁻¹
 Kilometer = km
 Liter = L
 Meter = m
 Micron = µm
 Microliter = µL
 Milligram = mg
 Milliliter = mL
 Millimeter = mm
 Millimicrons = mµ
 Minute = min
 Nanometer = nm
 Second = s
 Temperature = temp
 Ton = t

Some useful references for writing scientific articles in the RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.

Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub/1/.

© Copyright Sociedad Mexicana de Fitopatología