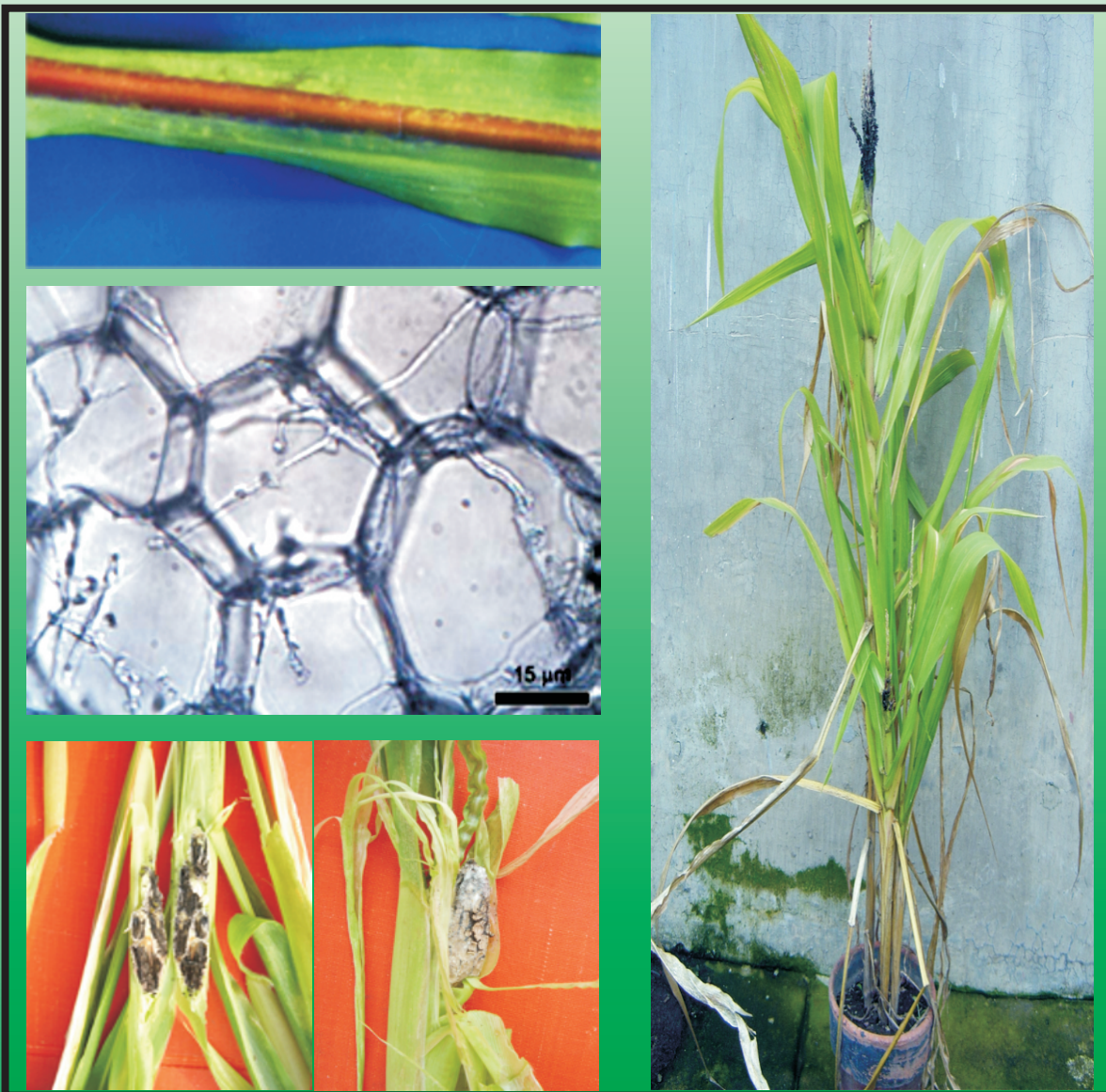


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 31 NÚMERO 2, 2013



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

La Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN-2007-8080) 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.socmexfito.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, de lo cual el costo editorial incluirá la traducción total mas \$1000 pesos por manuscrito. 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. 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.socmexfito.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 appear in Spanish and English, which the publisher will include total translation cost plus \$ 1000 pesos per manuscript. 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. 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://socmexfito.org/>

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 Rebolgar 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. Hilda Victoria Silva Rojas Colegio de Postgraduados
Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez Colegio de Postgraduados
Dra. María de Jesús Yáñez Morales Colegio de Postgraduados
Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa Colegio de Postgraduados
Dr. Alejandro Casimiro Michel Aceves Colegio Superior Agropecuario, Estado de Guerrero
Dr. Gerardo Leyva Mir Universidad Autónoma Chapingo
Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez Colegio de Postgraduados
Dr. Remigio Anastacio Guzmán Plazola Colegio de Postgraduados
Dr. Daniel Téliz Ortiz Colegio de Postgraduados

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

Volumen 31, número 2, 2013

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Scientific articles)

Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton {Evaluation of inoculation methods on maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton}. Quezada Salinas A, De León García De Alba C, Hernández Anguiano AM y Nava Díaz C. 80

Tolerancia al estrés hídrico y fitosanitario mediante indicadores agronómicos y fisiológicos en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) {Tolerance to water and plant stress through agronomic and physiological indicators in different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties}. Pedroza Sandoval A, Trejo Calzada R, Chávez Rivero JA y Samaniego Gaxiola JA.

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger* {Antifungal activity *in vitro* of the aqueous extracts of spice's against *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*}. Cáceres Rueda de León I, Colorado Vargas R, Salas Muñoz E, Muñoz Castellanos LN y Hernández Ochoa L. 105

ARTÍCULOS DE REVISIÓN (Review articles)

Estado actual de *Peronospora sparsa*, causante del Mildiu Velloso en rosa (*Rosa* sp.) {Current status of *Peronospora sparsa*, causal agent of Downy Mildew on rose (*Rosa* sp.)}. Álvarez Romero PI, García Velasco R, Mora Herrera ME, González Díaz JG y Salgado Siclán ML. 113

El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y perspectivas {The genus *Aspergillus* and their mycotoxins in maize in Mexico: Problems and perspectives} Martínez Padrón HY, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA y Vázquez Carrillo G. 126

Aspectos fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control {Fundamental aspect of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, pathogenicity and control} Francisco Francisco N, Gallegos Morales G, Ochoa Fuentes YM, Hernández Castillo FD, Benavides Mendoza A y Castillo Reyes F. 147

NOTAS FITOPATOLÓGICAS (Phytopathological notes)

91 **Etiología de la marchitez de plantas de chayote (*Sechium edule*) en el estado de Veracruz** {Etiology of chayote (*Sechium edule*) wilting plants in the state of Veracruz} Olguín Hernández G, Valdovinos Ponce G, Cadena Iñiguez J y Arévalo Galarza ML. 161

Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani* {Essential oils and aqueous extracts for the *in vitro* management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*} Vásquez Covarrubias DA, Montes Belmont R, Jiménez Pérez A y Flores Moctezuma HE. 170

Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli {Reduction in the *in vitro* germination of conidia of *Alternaria alternata* isolated from *Eruca sativa* with juice of broccoli} Flores Córdova MA, Martínez Damián MT, Nieto Ángel D, Rodríguez Pérez JE, Colinas León MT y Martínez Solís J. 180

Evaluación de Métodos de Inoculación de Semillas de Maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kûhn) Langdon & Fullerton

Evaluation of Inoculation Methods on Maize Seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kûhn) Langdon & Fullerton

Andrés Quezada Salinas, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Guillermo Pérez Valenzuela 127, Colonia Del Carmen, Delegación Coyoacán, México D.F., CP. 04100, México; **Carlos De León García De Alba**, **Ana María Hernández Anguiano**, **Cristian Nava Díaz**, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, CP. 56230, México. Correspondencia: andresqs@colpos.mx

(Recibido: Septiembre 20, 2013 Aceptado: Febrero 26, 2014)

Quezada Salinas A, De León García De Alba C, Hernández Anguiano AM y Nava Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kûhn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 80-90.

Resumen. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de inoculación con teliosporas del hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en semillas de maíz que resulte en un alto y consistente porcentaje de infección de plántulas, e implementarlo en programas de selección de germoplasma resistente a este patógeno. Semillas de maíz susceptible a la enfermedad se inocularon con diferentes métodos que permitieron el contacto entre patógeno y hospedante (teliosporas-semilla). Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con suelo estéril en condiciones de 25 °C y fotoperíodo de 12 h luz. A 25 d después de la siembra se cuantificó el número de plántulas infectadas mediante la observación de micelio en el mesocotilo. Se determinó que semillas inoculadas con una suspensión de 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ y 1% de carboximetilcelulosa de sodio, produjeron 93.3 y 96.6% de infección en plántulas de maíz susceptible del criollo Blanco de Toluca y del híbrido AS-910, respectivamente. En plántulas infectadas se observó micelio intracelular en el parénquima del mesocotilo sin provocar síntomas visibles, en plantas adultas se presentó la formación de soros en la panoja y mazorca. La identidad del micelio presente en el mesocotilo se confirmó mediante la técnica de PCR usando los iniciadores específicos SR1 y SR2.

Palabras clave adicionales: *Zea mays*, carbón de la espiga, carboximetilcelulosa, teliosporas.

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (sin. *Sphacelotheca*

Abstract. The objective of this work was to develop an inoculation method with teliospores of the fungus *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in maize seeds resulting in a consistently high rate of infection of seedlings, and implement its use in maize germplasm selection programs for resistant to this pathogen. Susceptible maize seeds to the disease were inoculated with different methods that allowed the contact between pathogen and host (teliospores-seed). Inoculated seeds were planted in pots with sterile soil under conditions of 25 °C and photoperiod of 12 h light. At 25 d after sown, the number of infected seedlings was measured by the observation of mycelium into the mesocotyl. Results determined that inoculated seeds with a suspension of 1.7×10^7 teliospores mL⁻¹ and 1% of sodium carboxymethylcellulose, produced 93.3 and 96.6% of infected seedlings in susceptible criollo Blanco de Toluca and hybrid AS-910 maize cultivars, respectively. Intracellular mycelium in infected seedlings was observed in the mesocotyl's parenchyma without cause visible symptoms, in adult plants was detected the formation of sori in the tassel and cob. The identity of mycelium present in the mesocotyl was confirmed by PCR test with the use of the specific primers SR1 and SR2.

Additional keywords: *Zea mays*, head smut, carboxymethylcellulose, teliospores.

The head smut of maize (*Zea mays* L.) disease, caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (sin. *Sphacelotheca reiliana*), is found in several countries in Europe, North and South America, China, Australia, New Zealand, Western India, Palestine, and other countries. In Mexico, it is of major importance in the Bajío area where it caused losses of up to 30 % from 1956- 1961. This disease is present in the states of Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas and

reiliana), se encuentra en varios países de Europa, Norte y Sur de América, China, Australia, Nueva Zelanda, India occidental, Palestina, y otros países. En México, es de mayor importancia en la zona del Bajío donde ocasionó pérdidas de 30% de 1956-1961. Esta enfermedad se encuentra presente en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes (Aquino *et al.*, 2011).

La reducción en la producción por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se debe principalmente a la infección sistémica y a la producción de soros que reemplazan parcial o totalmente a la mazorca y panoja durante la floración, afectando así la producción de grano. Los soros son estructuras fructíferas que contienen teliosporas, las cuales en el siguiente ciclo de cultivo germinan en el suelo, producen un basidio de cuatro células y cada célula origina una basidiospora haploide (Ingold, 1994). La unión de dos basidiosporas haploides compatibles dan origen al dicarion (hifa parasítica), que penetra la raíz de las plántulas de maíz (Martínez *et al.*, 2000) e invade los tejidos en forma sistémica hasta llegar al meristemo apical (Martínez *et al.*, 1999).

Debido a que la infección ocurre durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de la plántula de maíz, la principal estrategia de control se basa en la aplicación de fungicidas a la semilla para evitar el contacto entre el patógeno y el hospedante durante estas etapas (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez y Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante la evaluación de la expresión de la enfermedad se han identificado variedades e híbridos de maíz tolerantes (Stromberg *et al.*, 1984; Aquino *et al.*, 2011). Por lo tanto, la obtención de materiales resistentes es el método más efectivo de control del carbón de la espiga, por ello se requieren técnicas de inoculación efectivas para promover la infección del hospedante por el patógeno. Para lograr la infección de plántulas de maíz, se han usado mezclas de suelo con teliosporas y su deposición junto con semillas (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985b; Whyte y Gevers, 1988; Pradhanang y Ghimire, 1996), suspensiones de teliosporas aplicadas al momento de la siembra (Baggett y Koepsell, 1983; Martínez y Ledesma, 1990), inoculación hipodérmica de plántulas con basidiosporas (Craig y Frederiksen, 1992), e infiltración de teliosporas a la semilla mediante la generación de vacío (Metha, 1967). Sin embargo, estos métodos producen porcentajes de infección que varían de 5 a 95.8 %, lo cual limita su utilidad en un programa de selección de resistencia a la enfermedad.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un método de inoculación eficaz y, con el cual se obtenga un alto y consistente porcentaje de infección de plantas, con la finalidad de que pueda implementarse en programas de selección de germoplasma de maíz resistente a la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y almacenaje de teliosporas. En el verano de 2006 se recolectaron panojas y mazorcas de plantas de maíz infectadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, en lotes con siembras comerciales de maíz en el

Aguascalientes (Aquino *et al.*, 2011).

The reduction in production by *S. reilianum* f. sp. *zeae* is mainly due to systemic infection and sori production that partially or completely replace the tassel and ear during the flowering stage, thus affecting the grain production. Sori are structures containing teliospores, which in the following crop cycle they germinate in the soil, produce a four-celled basidium and each cell originate a haploid basidiospore (Ingold, 1994). The union of two compatible haploid basidiospores give rise to a dikaryon (parasitic hyphae) that penetrates the roots of maize seedlings (Martínez *et al.*, 2000) and invades tissues systemically until reaching the apical meristem (Martínez *et al.*, 1999).

Because infection occurs during germination and early seedling development of maize, the main control strategy is based on the application of fungicides directly to the seeds to prevent contact between the pathogen and the host during these stages (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez and Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Moreover, by evaluating the expression of the disease, tolerant varieties and hybrids of maize have been identified (Stromberg *et al.*, 1984; Aquino *et al.*, 2011). Therefore, obtaining resistant materials is the most effective control method for head smut disease, thus, effective inoculation techniques are required to promote the infection of the host by the pathogen. In order to achieve the infection of maize seedlings, mixtures of soil with teliospores have been used as well as their deposition with seeds (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985b; Whyte and Gevers, 1988; Pradhanang and Ghimire, 1996), teliospore suspensions applied at time of planting (Baggett and Koepsell, 1983; Martínez and Ledesma, 1990), hypodermic inoculation of seedlings with basidiospores (Craig and Frederiksen, 1992) and infiltration of teliospores to the seed by generating vacuum (Mehta, 1967). However, these methods produce a percentage of infection ranging from 5 to 95.8 %, which limits its utility in a resistance selection program to the disease.

Therefore, the aim of this study was to develop an effective inoculation method which helps to obtain a consistently high rate of plants infection, in order to be able to implement it in maize germplasm selection programs that are resistant to the disease.

MATERIALS AND METHODS

Collection and storage of teliospores. During summer 2006, tassels and maize ears of infected plants with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* were collected in maize commercial plots located in Mixquihuala Municipality, Hidalgo State, Mexico. The infected plant material was placed in plastic trays and allowed to dry for 7 d in a greenhouse, after that time, teliospores were collected and stored in paper bags at 20 ± 2 °C until use.

Viability of teliospores. Teliospores of *S. reilianum* f. sp. *zeae* were used. They were previously disinfested in a 1% (w/v) CuSO₄ aqueous solution for 24 h, washed with three changes of sterile distilled water and recovered on filter paper.

The viability of the inoculum was verified prior to

Municipio de Mixquiahuala, estado de Hidalgo, México. El material vegetal infectado se colocó en charolas de plástico y se dejó secar por 7d en un invernadero, para posteriormente recuperar las teliosporas en bolsas de papel, donde se conservaron a 20 ± 2 °C hasta su utilización.

Viabilidad de teliosporas. Se utilizaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* previamente desinfectadas en una solución acuosa a 1% (peso/volumen) de CuSO_4 por 24 h, lavadas con tres cambios de agua destilada estéril y recuperadas en papel filtro.

La viabilidad del inóculo se verificó previo a los tratamientos de inoculación en semilla. Para ello se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas mL^{-1} en agua destilada estéril y se depositó 1 mL por caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) preparado con papas (Gilchrist *et al.*, 2005). Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C y a 48, 72 y 96 h después cinco cajas se observaron directamente al microscopio, se contó el número de teliosporas germinadas por campo a una magnificación de 40X. Por cada caja se observaron cuatro campos y el promedio de germinación se registró en porcentaje.

Inoculación de semillas de maíz con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Semillas de maíz de los cultivares Criollo Blanco de Toluca (CBT) y del híbrido Aspros-910 (AS-910), ambos de endospermo blanco y susceptibles al carbón de la espiga, se desinfectaron con una solución a 1.5 % de NaOCl por 3 min, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se secaron a 22 °C sobre papel absorbente estéril. Luego, las semillas de ambos materiales se inocularon con teliosporas utilizando los siguientes métodos:

1. Carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC; marca libre: Droguería Metropolitana, México, D.F.). Se preparó una suspensión a 1 % de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En esta suspensión se incorporaron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

2. Cápsulas. Cápsulas farmacéuticas de gelatina rígida del número 1, se llenaron con 500 mg de teliosporas y se depositaron junto a semillas de maíz al momento de la siembra en macetas. Se colocó una cápsula por semilla.

3. Adyuvante de pesticidas (Agrocer® 010). Se preparó una suspensión a 0.2% (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

4. Dispersante (KEM-KOL^{MR}). Se preparó una suspensión a 0.2 % (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

5. Semilla impregnada con teliosporas. En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se mezclaron por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.

inoculation treatments in seeds. A 50 000 teliosporas mL^{-1} suspension was prepared in sterile distilled water and 1 mL per Petri dish was deposited with Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium prepared from potatoes (Gilchrist *et al.*, 2005). The dishes were incubated in darkness at 25 °C during 48, 72 and 96 h. Then, five dishes were directly observed under microscope, the number of germinated teliosporas per field were counted at 40X magnification. Four fields were observed per case, and the germination average was recorded as a percentage.

Inoculation of seeds with *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliosporas. Maize seeds of cultivars Criollo Blanco de Toluca (CBT) and Aspros-910 (AS-910) hybrid, both of white endosperm and susceptible to head smut disease, were disinfected with a 1.5 % NaOCl solution during 3 min, washed with three changes of sterile distilled water and dried at 22 °C on sterile absorbent paper. Then, the seeds of both materials were inoculated with teliosporas using the following methods:

1. Sodium carboxymethylcellulose (NaCMC; own brand: Droguería Metropolitana, Mexico, DF). A 1 % NaCMC and 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

2. Capsules. Pharmaceutical hard gelatin capsules Number 1, were filled with 500 mg of teliosporas and deposited with maize seeds at planting in pots. One capsule per seed was placed.

3. Pesticide Adjuvant (Agrocer® 010). A 1.7×10^7 mL^{-1} teliosporas plus 0.2 % (v/v) suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

4. Dispersant (KEM-KOL^{MR}). A 1.7×10^7 mL^{-1} teliosporas plus 0.2% (v/v) suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

5. Seed impregnated with teliosporas. In a 20 x 14.5 cm polyethylene bag, 3 g of teliosporas were deposited, 50 maize seeds were added and mixed for 1 min, then recovered and placed individually on polystyrene plates.

6. Seeds with mechanical damage and impregnated with teliosporas. In order to cause damage to the surface of the seed, 50 maize seeds were rubbed for 1 min between two abrasive papers No. 4, then they were placed in a polyethylene bag of 20 x 14.5 cm with 3 g of teliosporas and mixed for 1 min, then recovered and placed individually on polystyrene plates.

7. Acrylic enamel (Aero Comex^{MR}). In a 20 x 14.5 cm polyethylene bag, 3 g of teliosporas were mixed with 50 maize seeds and stirred for 1 min. The seeds were collected and, after spray them with spray enamel for 1 min, they were dried at 22 °C on polystyrene plates at room temperature (22 °C) for 48 h.

8. Blank. Disinfested seed.

Maize seeds inoculated in previous treatments were sown in pots with sterile soil (pH 8.0), 5.08 dSm⁻¹ electrical

6. Semillas con daño mecánico e impregnadas con teliosporas. Para ocasionar daños sobre la superficie de la semilla, entre dos papeles lija No. 4 se frotaron 50 semillas de maíz por 1 min, posteriormente se depositaron en una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm con 3 g de teliosporas y se mezclaron por 1 min, luego se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.

7. Esmalte acrílico (Aero Comex^{MR}). En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se agitaron por 1 min. Las semillas se extrajeron y, después de rociarlas con esmalte en aerosol por 1 min, se secaron a 22 °C sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

8. Testigo. Semilla desinfectada.

Las semillas de maíz inoculadas de los tratamientos anteriores se sembraron en macetas con suelo estéril con pH de 8.0, conductividad eléctrica de 5.08 dSm⁻¹, contenido de materia orgánica de 3.23% y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Las macetas se colocaron en una cámara bioclimática (Modelo CEL 38-15), distribuidas en un diseño de bloques completos al azar con siete unidades experimentales (repeticiones), a 25 °C con un fotoperíodo de 12 h luz, generado por 16 lámparas de luz blanca fluorescente de 160 watts. Cada unidad constó de una maceta con cinco semillas inoculadas. La variable evaluada fue: número de plántulas infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae* expresada en porcentaje.

Evaluación de la infección. El porcentaje de plántulas infectadas, registrado en los diferentes tratamientos, se determinó mediante la detección de micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* 25 d después de la siembra. Para esto se realizaron cortes transversales del mesocotilo con navaja de afeitar en el microscopio estereoscópico. Las secciones se tiñeron con azul de algodón al 0.5 % en lactofenol por 3 min, se colocaron en una solución de safranina al 1 % en etanol 70 % por 1 min, y se lavaron en glicerol al 70 % por 1 min. Las secciones se montaron en glicerol al 70 % y se examinaron en un microscopio compuesto (40X). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), con el paquete estadístico SAS (1999). Las imágenes de tejido se tomaron con una cámara digital (Moticam 2300).

Plántulas inoculadas de cada tratamiento se conservaron en macetas bajo las mismas condiciones en la cámara bioclimática para registrar desarrollo de síntomas característicos de la enfermedad.

Identidad molecular del micelio infectivo. La identidad del micelio observado en los tejidos del mesocotilo se verificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los iniciadores SR1 y SR2, 5' CAGGTTATGTATGGGCCG-3', 5' TTGAGCGATGACCATTCC-3', respectivamente, específicos para *S. reilianum* f. sp. *zeae* que amplifica ADN genómico (Xu *et al.*, 1999). Para la extracción de ADN, tanto de tejido vegetal como de basidiosporas se utilizó el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2009) siguiendo el protocolo especificado.

conductivity, 3.23 % organic matter content and sandy-loam texture (75.6 % sand, 14.5 % lime and 9.9 % clay). The pots were placed in a bioclimatic chamber (Model CEL 38-15), distributed in a completely randomized blocks design with seven experimental units (replicates) at 25 °C with a photoperiod of 12 h light generated with 16 lamps of white fluorescent light of 160 watts. Each unit consisted in one pot with five inoculated seeds. The variable evaluated was: number of infected seedlings with *S. reilianum* f. sp. *zeae* expressed as a percentage.

Evaluation of the infection. The percentage of infected seedlings in the different treatments, was determined by detecting the mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zeae* 25 d after sowing. For this purpose, cross-sections cuts of mesocotyl with a razor in the stereomicroscope were done. Sections were stained with 0.5 % cotton blue in lactophenol for 3 min, placed into a 1% safranin solution in 70 % ethanol for 1 min, and washed in 70 % glycerol for 1 min. The sections were mounted in 70 % glycerol and examined under a compound microscope (40X). The data obtained were analyzed with ANOVA and Tukey's mean separation ($\alpha = 0.05$), with the statistical software SAS (1999). Tissue images were taken with a digital camera (Moticam 2300).

Inoculated seedlings of each treatment were kept in containers under the same conditions in the bioclimatic chamber to register the development of characteristic symptoms of the disease.

Molecular identity of the infective mycelium. The identity of the mycelium observed in the tissues of the mesocotyl was verified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers SR1 and SR2, 5' CAGGTTATGTATGGGCCG-3', 5' TTGAGCGATGACCATTCC-3', respectively, specific for *S. reilianum* f. sp. *zeae* that amplifies genomic DNA (Xu *et al.*, 1999). For DNA extraction, from both plant tissue and basidiospore, the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2009) was used according to the specified protocol.

DNA from plant tissue was obtained from the seedlings mesocotyl 25 d after sowing, coming from both, seeds inoculated with the fungus (1% NaCMC and 1.7 x 10⁷ teliospores mL⁻¹) and from non-inoculated (control) seeds. While fungus DNA was obtained from monosporidial cultures (basidiospore) of 72 h of growth at 25 °C in darkness according to Xu *et al.* (1999). Thus, 0.5 mL of suspension in sterile distilled water with 50 000 teliospores ml⁻¹ were distributed in PDA, and from the isolated colonies that were developed, samples were collected with a sterile loop for pure cultures of basidiospores in PDA.

PCR tests included a positive control (DNA of basidiospores), a negative control (DNA from plant tissue of non-inoculated control plants) and samples of inoculated plants (DNA from plant tissue of grown plants from inoculated seeds).

The reaction was carried out in a total volume of 50 L and for each reaction a PCR tube was used to mix the following reagents: 10 L of amplification buffer (GoTaq[®] Flexi Buffer, Promega), 5 L of MgCl₂ 25 M, 1 L of nucleotide mixture of 10 M each, 1 L of each primer at

El ADN de tejido vegetal se obtuvo del mesocotilo de plántulas 25 d después de su siembra, procedentes tanto de semillas inoculadas con el hongo (1 % de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹) como de semillas sin inocular (Testigo). Mientras que el ADN del hongo se obtuvo de cultivos monoesporidiales (basidiospora) de 72 h de crecimiento a 25 °C en oscuridad de acuerdo a Xu *et al.* (1999). Para esto, 0.5 mL de suspensión en agua destilada estéril con 50 000 teliosporas mL⁻¹ se distribuyeron en PDA y de las colonias aisladas que se desarrollaron se tomaron muestras con un asa estéril para cultivos puros de basidiosporas en PDA.

Las pruebas de PCR incluyeron un testigo positivo (ADN de basidiosporas), un testigo negativo (ADN de tejido vegetal de plantas testigo sin inocular) y muestras de plantas inoculadas (ADN de tejido vegetal de plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL y por cada reacción se utilizó un tubo para PCR en el cual se adicionaron los siguientes reactivos: 10 µL de buffer de amplificación (GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 5 µL de MgCl 25 M, 1 µL de mezcla de nucleótidos a 10 M de cada uno, 1 µL de cada iniciador a 1 µM, 0.25 µL de la enzima GoTaq® ADN polimerasa (5u/µL), 4 µL de DNA correspondiente y 27.75 µL de agua libre de nucleasa. Los reactivos se mezclaron con un paso de vórtex y la mezcla se centrifugó por 5 s. Las reacciones PCR se realizaron en un termociclador (TC-300, Techne®) con los siguientes parámetros: 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C, seguido por 36 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C. El programa finalizó con 10 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % a 85 V durante 40 min, se tiñeron con bromuro de etidio a 1mg L⁻¹ y visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc 2000, BIO-RAD®). La detección de un fragmento de 0.96 kb fue evidencia de la presencia de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en el tejido vegetal, de acuerdo a Xu *et al.* (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Viabilidad de teliosporas. En medio de cultivo PDA a 25 °C, se registró 19, 29.8 y 35.4 % de germinación de teliosporas después de 48, 72 y 96 h, respectivamente. Las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células (Figura 1), cada una de las cuales originó una basidiospora que desarrolló colonias tipo levadura de color crema.

Los porcentajes de germinación de teliosporas observados en esta investigación después de 48 h de incubación fueron superiores en 7 puntos porcentuales a los reportados por Osorio y Frederiksen (1998), quienes obtuvieron germinaciones máximas de 12% en PDA después de 48 h de incubación en oscuridad a 28 °C. Las diferencias podrían deberse a las condiciones de almacenaje, incubación y medio de crecimiento utilizado. Pai y Pan (1964) observaron que teliosporas de *S. reilianum* almacenadas por 30 d sobre papel húmedo a 30-35 °C germinaron a una tasa de 60-90 % en una solución de sucrosa 1 %; sin embargo, cuando se mantuvieron durante el mismo tiempo en un ambiente frío y seco, la germinación fue de 10 %. En el presente estudio teliosporas conservadas

1 M, 0.25 L of the enzyme GoTaq® DNA polymerase (5u/µL), 4 L of corresponding DNA and 27.75 L of nuclease-free water. The reagents were mixed in a vortex and centrifuged for 5 s. The PCR reactions were performed in a thermocycler (TC- 300, Techne®) with the following parameters: 1 cycle of 4 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 72 °C followed by 36 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 72 °C. The program ended with 10 min at 72 °C. Amplified products were separated by 1% agarose gel electrophoresis at 85V for 40 min, stained with ethidium bromide at 1 mg L⁻¹ and displayed on a gel photodocumentation system (Gel Doc 2000, Bio-Rad®). The detection of a 0.96 kb fragment was evidence of the presence of *S. reilianum* f. sp. *zeae* in plant tissue according to Xu *et al.* (1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Viability of teliosporas. In PDA medium at 25°C, the 19, 29.8 and 35.4 % of teliospores germination was observed after 48, 72 and 96 h, respectively. Teliospores formed a septate basidium with four cells (Figure 1), and each of them gave rise to a basidiospore that developed colonies type yeast of cream color.

The germination percentages of teliospore observed in this study after 48 h of incubation were higher by 7 percentage points than those reported by Osorio and Frederiksen (1998), who obtained maximum germination of 12 % on PDA after 48 h of incubation in darkness at 28 °C. The differences could be due to storage conditions, incubation and growth media used. Pai and Pan (1964) reported that teliospores of *S. reilianum* stored for 30 d on wet paper at 30-35 °C germinated at a rate of 60-90 % in a 1 % sucrose solution; however, when kept during the same time in a cool, dry environment, germination was only 10%. In the present study, the teliospores stored in paper bags at 20 ± 2 °C registered maximum germination percentage of 35.4 %.

Evaluation of inoculation treatments. After each treatment with the fungus in control plants and in those without infections, there was no mycelium and no morphological alterations in the cells of the tissues of the mesocotyl (Fig. 2A -2C). In contrast, in the mesocotyl of the infected seedlings, specifically in the parenchyma and the area close to the endodermis, a thin intracellular mycelium (0.9-1.3 µm) was observed, smooth and septate (Figure 2D -2F) corresponding to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, this was developed without causing alterations in colonized cells or visible symptoms; however, xylem and phloem didn't proliferate. This coincides with Martinez *et al.* (1999) reports, who observed that the infected cells of the vegetative meristem have normal activity, so that the fungus acts as a biotrophic endophyte until sporogenesis, which occurs in the floral meristem. Meanwhile, Matyac (1985) reported the presence of mycelium of *Sphacelotheca reiliana* in the phloem and xylem of maize plants, but this contrasts with the findings in this study, as no infective mycelium was found in these tissues.

In the present study, it was observed that the differential staining method with cotton blue in 0.5 %

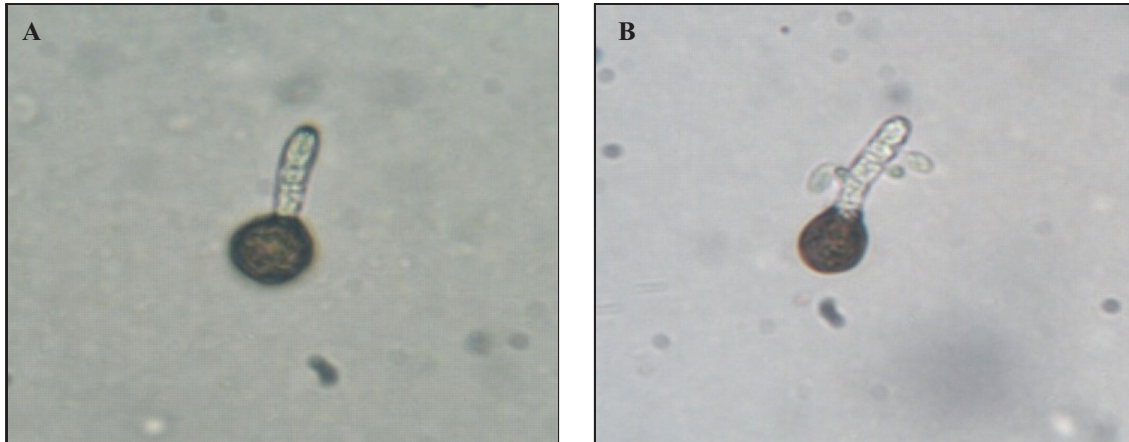


Figura 1. Teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* en medio de cultivo PDA. A) Germinación de teliospora y desarrollo de basidio. B) Basidio con producción de basidiosporas. Colegio de Postgraduados, 2010.

Figure 1. Teliospores of *Sporisorium reilianum* f. sp. in PDA culture medium. A) Teliospore germination and development of basidium. B) Basidium with basidiospores production. Colegio de Postgraduados, 2010.

en bolsas de papel a 20 ± 2 °C registraron un porcentaje máximo de germinación de 35.4%.

Evaluación de los tratamientos de inoculación. En las plantas testigo y en las que resultaron libres de infección, después de cada tratamiento con el hongo, no se registró micelio ni alteraciones morfológicas en las células de los tejidos del mesocotilo (Figura 2A-2C). En contraste, en el mesocotilo de las plántulas infectadas, específicamente en el parénquima y la zona cercana a la endodermis, se observó micelio intracelular delgado ($0.9\text{-}1.3\ \mu\text{m}$), liso y septado (Figura 2D-2F) correspondiente a *S. reilianum* f. sp. *zae*, este se desarrolló sin causar alteraciones en las células colonizadas ni síntomas visibles; sin embargo, no proliferó en el xilema y floema. Lo anterior coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (1999), quienes observaron que las células infectadas del meristemo vegetativo tienen una actividad normal, por lo que el hongo actúa como un endófito biotrófico hasta el momento de la esporogénesis, la cual ocurre en el meristemo floral. Por su parte, Matyac (1985) reportó la presencia de micelio de *Sphacelotheca reiliana* en el floema y el xilema de plantas de maíz, esto contrasta con lo observado en este trabajo, ya que no se encontró micelio infectivo en esos tejidos.

En este estudio se observó que el método de tinción diferencial con azul de algodón a 0.5 % en lactofenol y safranina a 1 % en etanol a 70 %, desarrollado durante este trabajo, permite diferenciar los tejidos vegetales de la plántula de maíz y el micelio de *S. reilianum* f. sp. *zae* resultando en una rápida identificación de plántulas infectadas cuando se realizan cortes transversales del mesocotilo a 25 d después de la siembra de semillas inoculadas, lo cual indica que a este período de tiempo el patógeno ya ha penetrado en el hospedante, esto coincidiendo con lo reportado por Martínez *et al.* (2002), quienes determinaron que a tres semanas después de la inoculación, plántulas cultivadas *in vitro* no presentan síntomas; sin embargo, la superficie de la raíz fue ampliamente colonizada con micelio de *S. reilianum* f. sp.

lactophenol and 1 % safranin in 70 % ethanol, developed during this study, allows to differentiate plant tissues of maize seedling and mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zae* resulting in a rapid identification of infected seedlings when cross sections are made to the mesocotyl after 25 d of sowing inoculated seeds, indicating that at this time the pathogen has penetrated the host, coinciding with Martínez *et al.* (2002) reports, who found that after three weeks of inoculation, the cultured *in vitro* seedlings show no symptoms; however, the surface of the root was extensively colonized with mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zae* that penetrated through the cells of the epidermis, and in some cases the cells of the root were completely invaded by the fungus.

On the other hand, the infected plants developed symptoms characteristic of the disease (Matyac and Kommedahl, 1985b; Pataky, 1999). After 45 d of the emergence and from the fourth leaf, chlorotic spots (1-2 mm diameter) were observed in both, the leaf blade and midrib (Figure 3A). In cross sections of these chlorotic areas, the presence of intracellular mycelium was more abundant in the chlorosis area (Figure 3B). Similar observations were made by Foster and Frederiksen (1977) and Martínez *et al.* (2002), who documented the development of chlorotic spots on leaves as the first symptom in the disease development in seedlings. In this paper, both the seedlings of the CBT cultivar as well as the AS-910 hybrid, showed chlorotic spots in early stages and subsequently developed sori during the flowering stage. Therefore, the appearance of these small chlorotic spots could be used as an indicator of infection by *S. reilianum* f. sp. *zae* in maize. Previously, Matyac and Kommedahl (1985b) used this symptom as an indirect indicator of infection in artificially inoculated plants grown on greenhouse. After 102 d of plating, sori formed in the tassel and maize ear of the plants. The tassels were partially invaded by smut, affecting the development of spikelets and thus pollen production (Figure 3D). Also, on the maize ear grain formation was not presented because

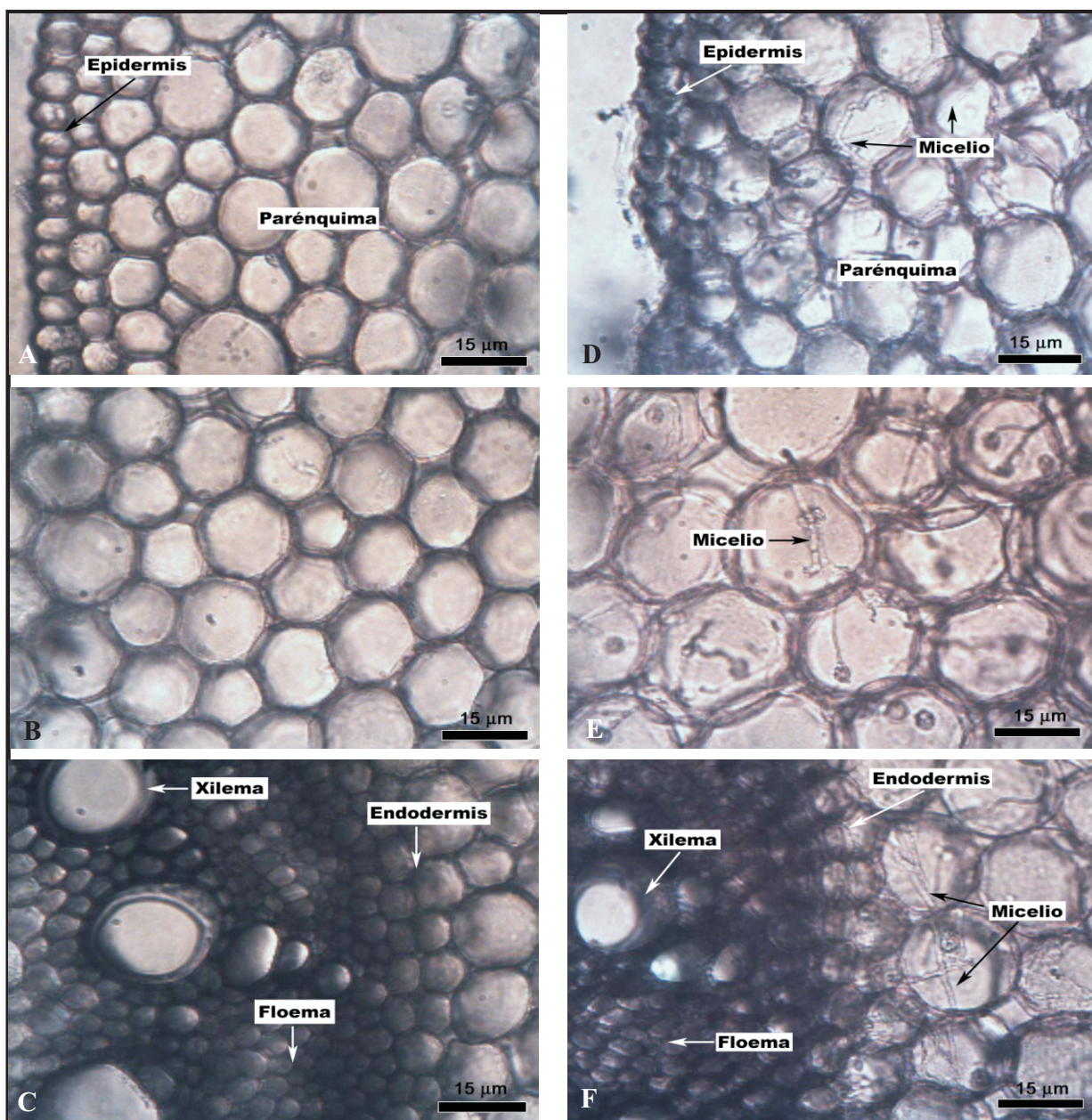


Figura 2. Cortes transversales de tejido del mesocotilo de plántulas de maíz 25 d después de la siembra. A-C) Tejido de plántula no infectada. D-F) Tejido de plántula infectada. A) Células de la epidermis y parénquima. B) Células del parénquima. C) Células de la endodermis y cilindro vascular. D y E) Células del parénquima infectadas con micelio de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. F) Micelio intracelular de *S. reilianum* f. sp. *zae* infectando a células del parénquima cercanas a la endodermis. Colegio de Postgraduados, 2010.

Figure 2. Cross sections of mesocotyl tissue from maize seedlings 25 d after sowing. A-C) non-infected seedling tissue. D-F) infected seedling Tissue. A) Cells of the epidermis and parenchyma. B) Cells of the parenchyma. C) Cells of the endodermis and vascular cylinder. D and E) Cells of the parenchyma infected with mycelium of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. F) Intracellular mycelium of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* infecting parenchymal cells near the endodermis. Colegio de Postgraduados, 2010.

zae el cual penetró a través de las células de la epidermis, y en algunos casos las células de la raíz fueron invadidas totalmente por el hongo.

Por otra parte, las plantas infectadas desarrollaron síntomas característicos de la enfermedad (Matyac y

these were replaced by sori development containing the teliospores (Figure 3C). Teliospores formation is the sporogenesis byproduct, which starts at the time of floral induction in maize (Martinez *et al.*, 2002). The total or partial replacement of the tassel and maize ear structures by

Kommedahl, 1985b; Pataky, 1999). A los 45 d después de la emergencia y a partir de la cuarta hoja, se registraron manchas cloróticas (1-2 mm de diámetro), tanto en la lámina foliar como en la nervadura central (Figura 3A). En cortes transversales de estas zonas cloróticas, se observó la presencia de micelio intracelular que fue más abundante en la zona con clorosis (Figura 3B). Observaciones similares fueron realizadas por Foster y Frederiksen (1977) y Martínez *et al.* (2002), quienes registraron el desarrollo de manchas cloróticas en hojas como el síntoma inicial en el desarrollo de la enfermedad en plántulas. En el presente trabajo, tanto las plántulas del cultivar CBT como las del híbrido AS-910 presentaron manchas cloróticas en etapas tempranas y posteriormente desarrollaron soros durante la etapa de floración. Por lo anterior, la aparición de estas

sori, is one of the major features of the infection and the development of the disease in maize by *S. reilianum* (Pataky, 1999; Matyac and Kommedahl, 1985a).

In this research, besides the evidence of the mycelium in the host tissue and the sori presence at the end of the experiment, the identity of the mycelium in the collected seedlings after 25 d of planting was molecularly confirmed. When DNA from plant tissue of seedlings grown from seeds inoculated with *S. reilianum* f. sp. *zetae* was used, a 0.96 kb segment was amplified with SR1 and SR2 primers. This fragment was also amplified from DNA of a pure culture of the fungus developed on PDA medium. The size of the 0.96 kb bands obtained coincides with Xu *et al.*, (1999) reports for *S. reilianum* f. sp. *zetae*. In contrast, no band was registered with DNA samples of plant tissue of

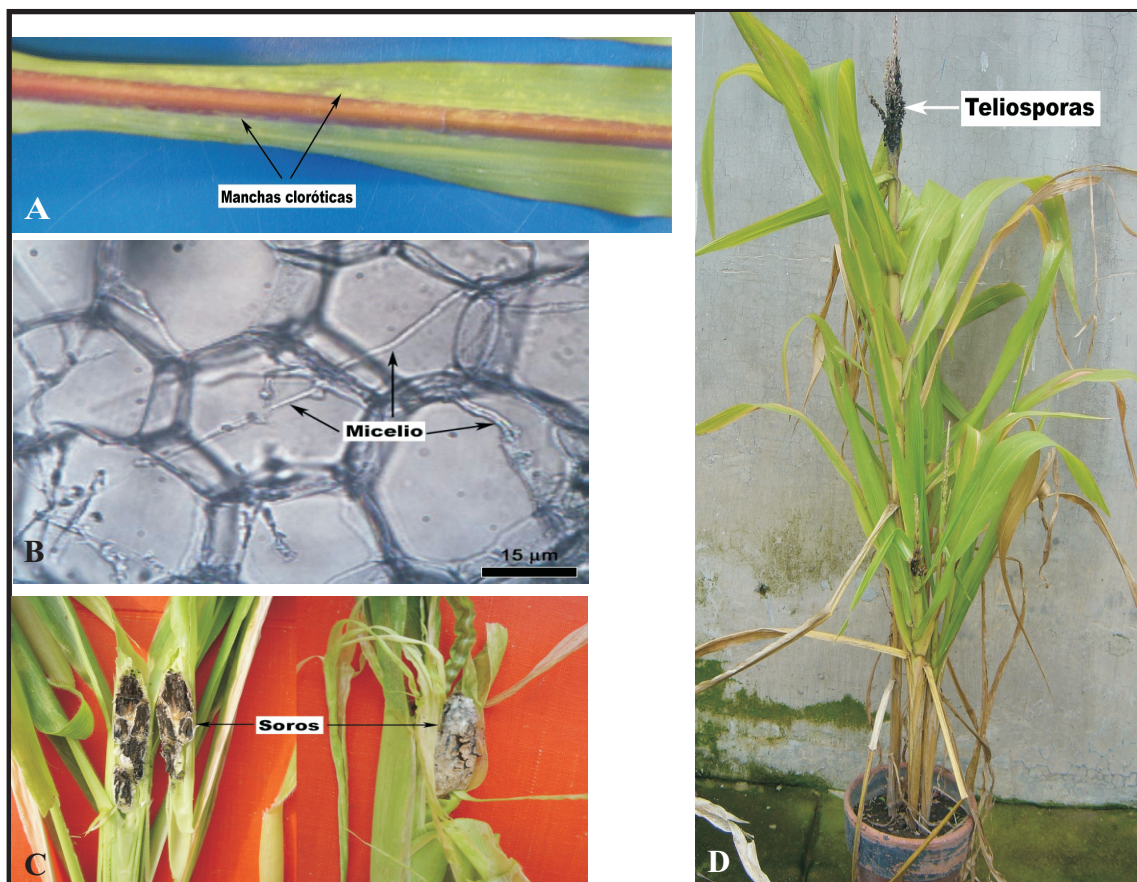


Figura 3. Material vegetal con síntomas y signos del carbón de la espiga del maíz por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae*. Material colectado de plantas del híbrido AS-910 desarrolladas a partir de semillas inoculadas con una suspensión de 1 % de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} , incubadas en condiciones controladas de 25 °C con 12 h de luz. A) Hoja con manchas cloróticas en nervadura central y lámina foliar 45 d después de la emergencia. B) Tejido con crecimiento de micelio intracelular obtenido de la zona clorótica de la hoja. C) Soros formados en la mazorca, 102 d después de la siembra. D) Planta adulta con teliosporas en la panoja. Colegio de Postgraduados, 2010.

Figure 3. Plant material with symptoms and signs of maize head smut caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae*. Material collected from plants of the AS-910 hybrid grown from inoculated seeds with a 1 % carboxymethylcellulose sodium and 1.7×10^7 mL^{-1} teliospores suspension, incubated under controlled conditions at 25 °C with 12 h of light. A) Leaf with chlorotic spots on midrib and leaf blade 45 d after emergence. B) Tissue with intracellular mycelium growth from the chlorotic leaf area. C) Sori formed on the ear, 102 d after sowing. D) Adult plant with teliospores on the tassel. Colegio de Postgraduados, 2010

pequeñas manchas cloróticas podría usarse como un indicador de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en maíz. Previamente, Matyac y Kommedahl (1985b) usaron este síntoma como un indicador indirecto de la infección en plantas inoculadas artificialmente y desarrolladas en invernadero. A los 102 d después de la siembra, se encontró formación de soros tanto en la panoja como en la mazorca de las plantas. Las panojas fueron parcialmente invadidas por el carbón, lo que afectó el desarrollo de las espiguillas y con ello la producción de polen (Figura 3D). Asimismo, en la mazorca no se presentó la formación de granos debido a que estos fueron reemplazados por el desarrollo de soros que contenían a las teliosporas (Figura 3C). La formación de teliosporas es el producto derivado de la esporogénesis, la cual inicia al momento de la inducción floral en maíz (Martínez *et al.*, 2002). El reemplazo total o parcial de las estructuras de la panoja y la mazorca por soros, es una de las principales características de la infección y del desarrollo de la enfermedad por *S. reilianum* en maíz (Pataky, 1999; Matyac y Kommedahl, 1985a).

En esta investigación, además de la evidencia del micelio en el tejido del hospedante y la presencia de soros al final del experimento contó con la confirmación molecular de la identidad del micelio en las plántulas colectadas después de 25 d de siembra. Cuando se utilizó ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae* se amplificó un segmento de 0.96 kb con los iniciadores SR1 y SR2. Este fragmento también se amplificó a partir de ADN de un cultivo puro del hongo desarrollado en medio de cultivo de PDA. El tamaño de las bandas obtenidas de 0.96 kb coincide con el reportado por Xu *et al.*, (1999) para *S. reilianum* f. sp. *zeae*. En contraste, ninguna banda se registró con las muestras de ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo (Figura 4).

El ANOVA detectó diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación, evaluados mediante el porcentaje de plántulas infectadas con micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* a 25 d después de la siembra (Cuadro 1). Tanto el cultivar CBT como el AS-910 presentaron infección cuando las semillas se inocularon con NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . Este tratamiento registró medias de 93.3 y 96.6 % de infección en CBT y AS-910, respectivamente, superando a los demás. Estos porcentajes de plántulas infectadas fueron superiores a los reportados por Baggett y Koepsell (1983), quienes al inocular semillas de maíz dulce de un cultivar susceptible, con metilcelulosa y teliosporas de *Sphacelotheca reiliana* obtuvieron como máximo 54.5 % de infección en campo. Por otra parte, la inoculación con cápsulas, semilla impregnada y esmalte produjo infección de plántulas en ambos materiales de maíz, pero sin ser significativamente diferentes del testigo.

CONCLUSIONES

La inoculación de semillas de maíz con una suspensión a 1 % de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, induce un 96.6 % de plántulas infectadas.

seedlings grown from seed not inoculated with the fungus (Figure 4).

ANOVA detected significant differences between inoculation treatments, which were evaluated by the percentage of infected seedlings with mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zeae* after 25 d of planting (Table 1). Both, CBT cultivar and AS-910, were infected when seeds were inoculated with NaCMC and 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . This treatment recorded averages of 93.3 and 96.6 % infection in CBT and AS-910, respectively, outperforming the rest. These percentages of infected seedlings were higher than those reported by Baggett and Koepsell (1983), who inoculated sweet maize seeds of a susceptible cultivar with methylcellulose and *Sphacelotheca reiliana* teliosporas, and they obtained a maximum of 54.5 % of infection in the field. On the other hand, inoculation with capsules, impregnated seed and enamel produced seedlings infection in both maize materials, but without being significantly different from the control.

CONCLUSIONS

The maize seed inoculation with a suspension of 1 % sodium carboxymethylcellulose and 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, induces a 96.6 % of infected seedlings.

The differential staining method of cotton blue with 0.5 % lactophenol and 1 % safranin in 70 % ethanol, applied in the mesocotyl crosscuts of maize seedlings 25 d after planting, is effective to differentiate *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* mycelium of plant tissues.

Acknowledgments. Thanks to the PM 0541 and PM 0542 projects: "Development of maize (*Zea mays*) cultivars for Mexico Highlands with high yield and resistance to head smut disease (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), funded by the Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio

Cuadro 1. Porcentaje promedio de plántulas de maíz infectadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos.

Table 1. Average percentage of maize seedlings infected with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, generated from inoculated seeds with teliosporas using different seed treatments.

Tratamiento	Infección de plántulas de maíz (%)	
	Criollo Blanco de Toluca	Híbrido AS-910
1) Carboximetilcelulosa de sodio	93.3 a ^z	96.6 a
2) Cápsulas	6.6 b	20.0 b
3) Adyuvante	0.0 b	6.6 b
4) Dispersante	0.0 b	6.6 b
5) Semilla impregnada	10.0 b	13.3 b
6) Semilla con daño	0.0 b	0.0 b
7) Esmalte	6.6 b	13.3 b
8) Testigo	0.0 b	0.0 b

^z Medias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

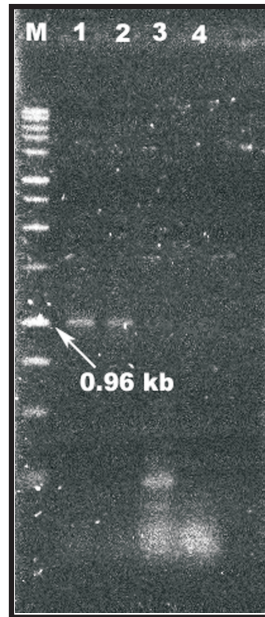


Figura 4. Productos de amplificación mediante PCR empleando el par de iniciadores SR1 y SR2; M. marcador molecular 1 kb; 1. ADN de colonias desarrolladas en medio de cultivo; 2. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*; 3. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo; 4. Agua. Colegio de Postgraduados, 2010.

Figure 4. PCR amplification products using the primers SR1 and SR2; M. 1kb molecular marker; 1. DNA of colonies developed in a culture medium; 2. DNA plant tissue of maize seedlings grown from inoculated seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*; 3. DNA plant tissue of maize seedlings grown from non- inoculated seeds; 4. Water. Colegio de Postgraduados, 2010.

El método de tinción diferencial con azul de algodón a 0.5 % en lactofenol y safranina a 1 % en etanol a 70 % aplicado en cortes transversales del mesocotilo de plántulas de maíz a 25 d después de la siembra, es efectivo para diferenciar el micelio de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* de los tejidos de la planta.

Agradecimientos. Al proyecto PM 0541 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para el primer autor.

LITERATURA CITADA.

Aquino MJG, Sánchez FA, González HA y Sánchez PJR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:39-49.
 Baggett JR and Koepsell PA. 1983. Field inoculation of sweet maize with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *Hortscience* 18:67-68.
 Craig J and Frederiksen RA. 1992. Comparison of sorghum seedling reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to sorghum head smut resistance classes. *Plant Disease* 76:314-318.

Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, Mexico). To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), for the scholarship number 176171 awarded to the first author.

Foster JH and Frederiksen RA. 1977. Symptoms of head smut in maize seedlings and evaluation of hybrids and inbreds. *In: Progress Report, Texas Agricultural Experimental Station.* 3423: January, 1-4.
 Gilchrist SL, Fuentes DG, Martínez CC, López ARM, Duveiller E, Singh RP, Henry M y García AI. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 8-9 pp.
 Ingold CT. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycological Research* 98:467-473.
 Martínez CA, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505-514.
 Martínez CA, Jauneau C, Roux C, Savy C and Dargent R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92.
 Martínez C, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253.
 Martínez RJL y Ledesma MJ. 1990. Control químico del

- carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:68-70.
- Matyac CA. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. *Phytopathology* 75:924-929.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on maize. *Phytopathology* 75:577-581.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on maize seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease* 69:251-254.
- Metha BK. 1967. Evaluation of physiological specialization in *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 57:925-928.
- Osorio JA and Frederiksen RA. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. *Plant Disease* 82:1232-1236.
- Pai CK and Pan SF. 1964. Studies on factors influencing the germination of the chlamydospores of *Sphacelotheca reiliana*. *Acta Phytopathologica Sinica* 7:53-60.
- Pataky JK. 1999. Smuts. *In: Compendium of maize diseases* (White D.G., ed). 3rd. Edition. APS Press. Saint Paul, Minnesota, USA. 33-35 pp.
- Pradhanang PM and Ghimire SR. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. *Tropical Agriculture* 73:325-328.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- Stienstra WC, Kommedahl T, Stromberg EL, Matyac CA, Windels CE and Morgan F. 1985. Suppression of maize head smut with seed and soil treatments. *Plant Disease* 69:301-302.
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA and Windels CE. 1984. Smut expression and resistance of maize to *Sphacllothecha reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68:880-884.
- Whythe IV and Gevers HO. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 78:65-68.
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetmaize (*Zea mays*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:23-26.
- Xu ML, Melchinger AE and Lübberstedt T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Disease* 83:390-395.

Tolerancia al Estrés Hídrico y Fitosanitario Mediante Indicadores Agronómicos y Fisiológicos en Diferentes Variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tolerance to Water and Plant Stress Through Agronomic and Physiological Indicators in Different Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties

Aurelio Pedroza Sandoval, Ricardo Trejo Calzada y José Antonio Chávez Rivero, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Dgo. CP 35230, México; **José Alfredo Samaniego Gaxiola**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Matamoros, Coah. Correspondencia: apedroza@chapingo.uruza.edu.mx

(Recibido: Noviembre 26, 2013 Aceptado: 18 Marzo, 2014)

Pedroza Sandoval A, Trejo Calzada R, Chávez Rivero JA y Samaniego Gaxiola JA. 2013. Tolerancia al estrés hídrico y fitosanitario mediante indicadores agronómicos y fisiológicos en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 91-104.

Resumen. Las plagas, enfermedades y la sequía son los principales factores adversos en la producción de frijol. El objetivo de este estudio fue evaluar, desde el punto de vista fitosanitario, diferentes variedades de frijol en dos contenidos de humedad edáfica: capacidad de campo (CC) y punto de marchitez permanente (PMP). Se usó un diseño en bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas. Las plagas presentes fueron la chicharrita (*Empoasca kraemeri*) y el minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis*); las principales enfermedades incidentes fueron la muerte pre y posemergente (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp.), tizón común (*Xanthomonas phaseoli*) y la virosis del frijol (BCMV). No hubo efecto de interacción entre los factores de variación. La variedad Mayocoba fue la más afectada por muerte pre y posemergente (62.5 %), pero menos afectada por tizón común. En general, la muerte pre y posemergente de plantas fue mayor (35.7 %), cuando la humedad del suelo fue próxima a PMP, aunque con menor conductancia y transpiración y mayor eficiencia fotosintética, respecto a cuando se mantuvo la humedad próxima a CC. La variedad Pinto Americano tuvo mayor estabilidad en su actividad fotosintética, al pasar de la condición favorable (CC) a la desfavorable (PMP).

Palabras clave adicionales: Estrés vegetal, Variedades frijol, Fotosíntesis, Fitosanidad.

El frijol es uno de los cultivos básicos en México. En 2012 se sembraron 1.87 millones de hectáreas, con una producción de 1.3 t (SAGARPA, 2013), el 87 % en condiciones de

Abstract. Pest, plant diseases and drought are the main problems in the production of beans. The objective of this study was to evaluate, from a plant health perspective, the response of different bean cultivars to Field Capacity (FC), and Permanent Wilting Point (PWP) of soil moisture. A randomized complete block design arranged in split-plot treatments was used. The main insect pests were the leafhopper (*Empoasca kraemeri*) and the leaf miner (*Xenochalepus signaticollis*). The main plant diseases during the season were the pre and post-emergence plant death (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp.), common blight (*Xanthomonas phaseoli*) and bean common mosaic virus (BCMV). No significant interaction effect was detected between factors. Mayocoba bean cultivar was significantly more affected in pre and post-emergence plant death (62.5 %), but less damaged by common blight. In general, the pre and post-emergence plant death was higher (35.7 %), when the plant soil moisture was near to PWP, associated to less conductance and transpiration, but higher photosynthetic efficiency, compared to when soil moisture was near FC. Pinto Americano cultivar was able to maintain photosynthesis stability to the change of optimum to suboptimum soil content.

Additional keywords: Plant stress, Beans cultivar, Photosynthesis, Plant Diseases.

Beans are one of the basic crops in Mexico. In 2012, 1.87 million hectares were planted and 1.3 tons were produced (SAGARPA, 2013), from those, 87 % was under rainfall conditions of high climatic risk, mainly drought. Beans are grown in practically all regions of the country and conditions of soil and climate, ranking second in importance by total surface planted nationwide, only after corn. National demand in recent years has been 910,000 t yr⁻¹, which sometimes has required imports, based on an

temporal de alto riesgo climático, principalmente la sequía. El frijol se cultiva prácticamente en casi todas las regiones del país y condiciones de suelo y clima, ocupando el segundo lugar en importancia por superficie sembrada total a nivel nacional, sólo después del maíz. La demanda nacional en los últimos años ha sido de 910, 000 t año⁻¹, lo cual en algunos períodos ha requerido de importaciones, con base en un déficit estimado de 400,000 t año⁻¹, lo anterior, por el impacto de siniestros de tipo biótico y abiótico y la disminución de la superficie dedicada a este cultivo. Adicionalmente, ante un escenario de menor oferta nacional e internacional, los precios del frijol se han incrementado de manera extraordinaria, correspondiente a un 68 % en EEUU y hasta un 100 % en México, no tanto reflejado en el productor, sino en el consumidor (Manríquez, 2012).

La principal limitante de la productividad es la escasa disponibilidad de agua, fenómeno que se agudiza en regiones con bajo régimen pluvial (Covarrubias y Velázquez, 2010). Aunado a lo anterior, debe agregarse otros factores de causalidad en el impacto negativo de la producción de este cultivo, como son los de tipo fitosanitario. Plagas, enfermedades y sequía, son a menudo factores de alto impacto en la reducción productiva de esta leguminosa y otros cultivos (CONAFOR, 2012), incrementando la vulnerabilidad económica de los productores y repercutiendo en los altos precios en el mercado. Significa que los factores de estrés, son causa de pérdidas económicas en los cultivos, como el frijol. El estrés vegetal se entiende como cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico, por ejemplo el crecimiento o fotosíntesis, por debajo de la tasa máxima respecto de la que podría alcanzar (Lambers *et al.*, 1998).

En la Comarca Lagunera de los Estados de Coahuila y Durango, el frijol se cultiva tanto en condiciones de riego como de temporal, ésta última mediante la cosecha de agua de ladera. En cualquiera de estos casos, el agua es el recurso crítico; en las zonas de riego ante el abatimiento del acuífero, se hace indispensable identificar especies y variedades, que mantengan su productividad con el mínimo de agua que se les pueda suministrar. En los cultivos de temporal, materiales genéticos deberán también ser útiles ante el errático y disminuido volumen pluviométrico anual del que se dispone, el cual en promedio es de 240 mm, pero que en los últimos 10 años, a causa de las sequías recurrentes, ha sido menor que el promedio histórico regional (Guzmán *et al.*, 2006).

Respecto al patosistema del frijol en el área de estudio, es común la incidencia de mosquita blanca (*Bemisia* spp), minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis* Baly) y esporádicamente algunos barrenadores del tallo; así como las enfermedades reconocidas como la pudrición de raíz (*Rhizoctonia solani* Kuhn y/o *Fusarium* spp), tizón común del frijol (*Xanthomonas phaseoli*) y el virus mosaico común del frijol (BMCV). Debido al complejo fitosanitario presente, es común el impacto negativo en la producción, más aún cuando se combina con los factores ambientales relacionados a la disponibilidad hídrica, tanto en exceso como en deficiencias (Pedroza y Samaniego, 2003). El

estimado 400,000 ton yr⁻¹ deficit, because of the impact of biotic and abiotic sinisters and decrease in the area devoted to this crop. Additionally, in a scenario of lower domestic and international supply, bean prices have increased dramatically, corresponding to 68 % in the U.S. and up to 100 % in Mexico, not so much reflected in the producer but the consumer (Manríquez, 2012).

The main constraint of productivity is the limited availability of water, a phenomenon that is exacerbated in regions with low rainfall regime (Covarrubias and Velázquez, 2010). Besides this, another causal factors in the negative impact of the production of this crop must be added, such as those of the phytosanitary type. Pests, diseases and drought, are often high impact factors in reducing the production of this legume and other crops (CONAFOR, 2012), increasing the economic vulnerability of producers and impacting the high prices in the market. Meaning that stressors cause economic losses in crops, such as beans.

Plant stress is defined as any biotic or abiotic environmental factor that reduces the rate of any physiological process, for example growth or photosynthesis, below the maximum rate compared to the one that could be achieved (Lambers *et al.*, 1998).

At the Comarca Lagunera region, in Coahuila and Durango states, beans are grown under both irrigated and rainfall, this latter by hillside water harvesting. In either case, water is the critical resource; in irrigated areas due to the decrease of the water subsoil, it is essential to identify species and varieties that maintain their productivity with minimal water. In rainfed crops, genetic materials should also be useful because of the erratic and decreased annual rainfall volume available, which on average is 240 mm, but in the last 10 years, because of recurrent drought, it has been lower than the historical regional average (Guzmán *et al.*, 2006).

Regarding the bean pathosystem in the study area, it is common the incidence of whitefly (*Bemisia* spp), leafminer (*Xenochalepus signaticollis* Baly) and sporadically some stem borers; as well as some recognized diseases such as root rot (*Rhizoctonia solani* Kuhn and/or *Fusarium* spp), common bacterial blight (*Xanthomonas phaseoli*) and bean common mosaic virus (BCMV). Due to this phytosanitary complex, is common the negative impact on production, especially when combined with environmental factors related to water availability, either in excess or deficiency (Pedroza and Samaniego, 2003). The aim of this study was to evaluate the impact of water deficit and plant pests and diseases in some agronomic and physiological components in three bean cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Geographic Location. The study was conducted in 2011 in the experimental field of the Regional Unit of Arid Zones of the Universidad Autónoma Chapingo in Bermejillo, Durango. The region is located in the parallel 26° 00' and 26° 10' north latitude and meridians 104° 10' and 103° 20' west longitude, and over 1000 to 2000 masl (CONANP, 2006). According to the Köppen climate

objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto del déficit hídrico y del fitosanitario en algunos componentes agronómicos y fisiológicos en tres cultivares de frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica. El estudio se llevó a cabo durante el 2011 en el Campo Experimental de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo, en Bermejillo, Durango. La región se encuentra ubicada en los paralelos 26° 00' y 26° 10' de Latitud Norte y los meridianos 104° 10' y 103° 20' de Longitud Oeste y sobre un rango de altitud sobre el nivel del mar que va de los 1000 a los 2000 metros (CONANP, 2006). De acuerdo con el sistema de clasificación climática de Köppen, modificada por García (1973), el clima del área es del tipo BWhw(e), el cual se interpreta como muy árido, semicálido con lluvias en verano y de amplitud térmica extremosa. La precipitación promedio anual es de 199.60 mm, siendo los meses de Julio y Agosto los más lluviosos con 36.1 y 39.7 mm, respectivamente.

Diseño y desarrollo del experimento. Se estableció un experimento en bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas con tres repeticiones, con un total de seis tratamientos por repetición producto del factorial 2x3. Las parcelas grandes fueron los niveles de humedad: favorable, cercano a la Capacidad de Campo (CC) (66 a 100 % de la humedad aprovechable) y desfavorable cercano al Punto de Marchitez Permanente (PMP) (0 a 33 % de la humedad aprovechable); considerando la humedad aprovechable (HA) como la diferencia entre CC y el PMP, expresada en porcentaje mediante la ecuación: $HA = (CC - PMP) / 100$. Las parcelas chicas fueron las variedades de frijol: Pinto Saltillo, Mayocoba y Pinto Americano. Para los contenidos de humedad, se estableció un sistema de riego presurizado con uso de cintilla, derivada a partir de una regadera principal y conexiones laterales a base de PVC para cada parcela grande, correspondiente a los contenidos de humedad, controladas mediante llave de paso, que permitiera la salida de agua de acuerdo al programa de riego. La siembra fue en cama de 0.30 m de altura y 0.8 m de ancho sembrando a dos hileras y colocada la cintilla entre las dos hileras de plantas y una distancia de 0.20 m entre camas. Cada tratamiento fue de 5 m de largo por 2 m de ancho (dos camas), donde la parcela útil correspondió a los dos surcos medios de las dos camas del tratamiento.

Para los tratamientos de contenido de humedad, se determinaron diferentes características físico-químicas del suelo, tales como: textura, densidad aparente, capilaridad, velocidad de infiltración, calidad del agua, evapotranspiración media diaria y el coeficiente experimental de evaporación, para lo cual se aplicó la metodología citada por Pedroza y Durán (2005). Las determinaciones de la Capacidad de Campo (CC) y el Punto de Marchitez Permanente (PMP), se efectuaron mediante la técnica de la olla de membrana citada por Richards (1948) y por el método biológico, citado por Gavander (1991). Se determinó que la CC fue de 30 %, en tanto que el PMP fue 12 %. El riego de pre-siembra fue generalizado a capacidad de campo; posterior a la siembra, se diferenciaron los

classification system modified by García (1973), the climate of the area is of the type BWhw(e) which is interpreted as very arid, semiwarm with rains in summer and extreme thermal amplitude. The average annual rainfall is 199.60 mm, being July and August the wettest months with 36.1 and 39.7 mm, respectively.

Design and development of the experiment. An experiment in a randomized block split plot arrangement was established with three replications, with a total of six treatments per replicate and product of the factorial 2x3. Large plots were the moisture levels: favorable, near Field Capacity (FC) (66 to 100 % of the available moisture) and unfavorable near the Permanent Wilting Point (PWP) (0 to 33 % of the available moisture); considering the available moisture (AM) as the difference between FC and PWP, expressed as a percentage by the equation: $AM = (FC - PWP) / 100$. Small plots were beans varieties: Pinto Saltillo, Mayocoba and Pinto Americano. For moisture contents, a pressurized irrigation system was established with use of tract irrigation, derived from a main sprinkler and lateral PVC connections to each large plot, corresponding to moisture content, controlled by a stopcock that allowed the water to flow on a scheduled irrigation. The planting bed was 0.30 m high and 0.8 m wide, plants in two rows with tract irrigation between them and a distance of 0.20 m between beds. Each treatment was 5 m long and 2 m wide (two beds), where the useful plot corresponded to the two middle rows of the two treatment beds.

For moisture content treatments, different soil physicochemical characteristics were determined, such as: texture, bulk density, capillarity, infiltration rate, water quality, daily evapotranspiration average and the experimental evaporation coefficient, by using the Pedroza and Duran (2005) methodology. Field Capacity (FC) and Permanent Wilting Point (PWP) determinations were made by using the pot membrane technique cited by Richards (1948) and the biological method, cited by Gavander (1991). FC was 30 %, while PWP was 12 %. The pre-sowing irrigation was widespread at field capacity; after the seeding, the moisture contents in the soil were differentiated. Therefore, watering times were established: in order to maintain favorable moisture content, soil moisture was allowed to lower at most one third of the available moisture (66 %), and then applying the recovery irrigation; while in order to keep the moisture content unfavorable, soil moisture was allowed to drop as much to 0 % and then proceeding to provide irrigation to a maximum of 33 % of the available moisture, then a recovery irrigation. In order to measure the moisture content, a meter Lutron Brand (Model PMS-714) was used, which measures soil moisture in real time with digital readout.

Variables evaluated. For each treatment 6 plants within useful plot were used as the sample size. The variables evaluated were: Pre-and postemergence death by direct counting in 2 m of each furrow of the useful plot; Vigor, by using a scale of 0-5, where 0 was complete absence of vigor, almost a wilting state, and 5 corresponded to the most vigorous plants; Iron chlorosis, assessed on a scale of 0-5, where 0 was no iron chlorosis and 5 a

contenidos de humedad en el suelo. Para ello, se establecieron los tiempos de riego: para mantener el contenido de humedad favorable, se dejó bajar la humedad del suelo cuando mucho 1/3 de la humedad aprovechable (66 %), procediendo a dar el riego de recuperación; en tanto que para mantener el contenido de humedad desfavorable, se dejó bajar la humedad del suelo cuando mucho a 0 % y, procediendo a dar el riego a un máximo de 33 % de la humedad aprovechable, dando un riego de recuperación. Para medir el contenido de humedad se usó un medidor Marca Lutron Modelo PMS-714, el cual mide la humedad edáfica en tiempo real con lectura digital.

Variabes evaluadas. Se usó un tamaño de muestra en cada tratamiento de 6 plantas dentro de la parcela útil. Las variables evaluadas fueron: Muerte pre y posemergente, mediante conteo directo, tomando 2 m lineales de cada surco de la parcela útil; Vigor, con uso de una escala de 0 a 5, donde 0 fue ausencia total de vigor, casi en estado de marchitez y, 5 correspondió a las plantas más vigorosas; Clorosis férrica, evaluada en una escala de 0 a 5, donde 0 fue ausencia de clorosis férrica y 5 el estado clorótico generalizado en la planta; Fitosanidad, medida con una escala de 0 a 5, donde 0 fue ausencia de daños por plagas y/o enfermedades y 5 para los casos de máximo daño, por cada plaga y enfermedad presente; Fotosíntesis (F) en $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con uso del medidor de fotosíntesis a base de rayos infrarrojos, IRGA Modelo LI-6400 (LI-COR Lincoln, Nebraska USA); Conductancia $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Transpiración (Tr) en $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Eficiencia fotosintética obtenida por el cociente F/Tr y temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$). Todas estas variables fueron medidas entre 10 y 11 am.

La evaluación de las principales plagas y enfermedades se efectuó en dos fases en el tiempo: prefloración (45 d después de la siembra) y floración (60 d después de la siembra). La evaluación de los parámetros fisiológicos se hizo durante la fase de floración.

Procesamiento de datos. Los datos se procesaron con el Programa estadístico SAS Versión 9.0, mediante el cual se realizaron diferentes análisis estadísticos como ANOVA y prueba de rango múltiple de medias Tukey ($\alpha=0.05$), para identificar efecto y diferencias entre tratamientos respectivamente. Para ello los valores ordinales fueron transformados a valores porcentuales, los cuales mediante prueba de homogeneidad de varianzas y los supuestos de normalidad, indicaron la pertinencia de los análisis paramétricos antes citados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plagas y enfermedades incidentes de mayor importancia fueron la chicharrita (*Empoasca kraemeri* Ross y Moore), el minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis* Baly), la muerte pre y posemergente asociada a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp, tizón común (*Xanthomonas phaseoli*) y el virus mosaico común del frijol (BCMV), con un promedio de severidad de daños del complejo fitosanitario de 58.4 %. Este patosistema regional, coincide en lo general por lo reportado por Pedroza y Samaniego (2003). No hubo efecto de interacción entre los

chlorotic state widespread in the plant; Plant health, measured on a scale of 0-5, where 0 was no damage by pests and/or diseases and 5 for the cases of maximum damage for each pest and disease present; Photosynthesis (P) in $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, measured with a photosynthesis IRGA meter based on infrared Model LI -6400 (LI-COR Lincoln, Nebraska USA); Conductance $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Transpiration (Tr) in $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Photosynthetic efficiency obtained by the ratio P/Tr and Leaf temperature ($^{\circ}\text{C}$). All these variables were measured between 10 and 11:00 a.m.

The assessment of major pests and diseases was conducted in two phases over time: preflowering (45 d after sowing) and flowering (60 d after sowing). The evaluation of physiological parameters was done during the flowering phase.

Data processing. Data were processed with the SAS version 9.0 statistical program, through which different statistical analysis such as ANOVA and Tukey multiple range mean ($\alpha = 0.05$) tests were performed. These analyses were done to identify effect and differences between treatments, respectively. These ordinal values were transformed to percentage values, which by homogeneity of variance test for and normality assumptions, indicated the relevance of the parametric analysis mentioned above.

RESULTS AND DISCUSSION

Pests and diseases of major incidence were: leafhopper (*Empoasca kraemeri* Ross and Moore), leafminer (*Xenochalepus signaticollis* Baly), the pre and postemergence death associated to *Rhizoctonia solani* Kuhn and *Fusarium* sp, common blight (*Xanthomonas phaseoli*) and bean common mosaic virus (BCMV), with an average of 58.4 % of damage severity of the phytosanitary complex. This regional pathosystem, coincides in general with Pedroza and Samaniego (2003) reports. For most of phytosanitary variables there was no interaction effect between the variation factors evaluated (soil moisture content and bean varieties), which shows the independence of both factors; except for physiological variables, where the interaction effects are statistically and graphically analyzed (Figures 8 to 12).

Effect of varieties on bean pathosystem. The Mayocoba variety was significantly ($P < 0.05$) more affected by pre-and postemergence (62.5 %) death, compared to 11 and 7.5 % of incidence identified in Pinto Saltillo and Pinto Americano, respectively (Figure 1). Common blight severity was significantly lower ($P < 0.05$) in the Mayocoba variety during the pre-flowering stage (Figure 2). In the flowering stage, the three varieties showed the same level of severity. In general, the viral disease was moderate in the three genetic materials and in the two evaluation stages. Leafhopper damage, although moderate was significantly lower in the Mayocoba variety during the flowering phase (Figure 3); but this variety presented a significantly higher iron chlorosis (Figure 4). This indicates that the latter variety has a high susceptibility to iron deficiency, caused by the unavailability of Fe that occurs in alkaline soils (Ortiz-Ortiz and Villanueva, 1990), which is a widespread characteristic in the region under study (Martinez *et al.*,

factores de variación evaluados (contenidos de humedad edáfica y variedades de frijol), para la mayoría de las variables fitosanitarias, lo que identifica la independencia de ambos factores; excepto para las variables fisiológicas, donde se analiza estadística y gráficamente, los efectos de interacción (Figuras 8 a 12).

Efecto de variedades en el patosistema del frijol.

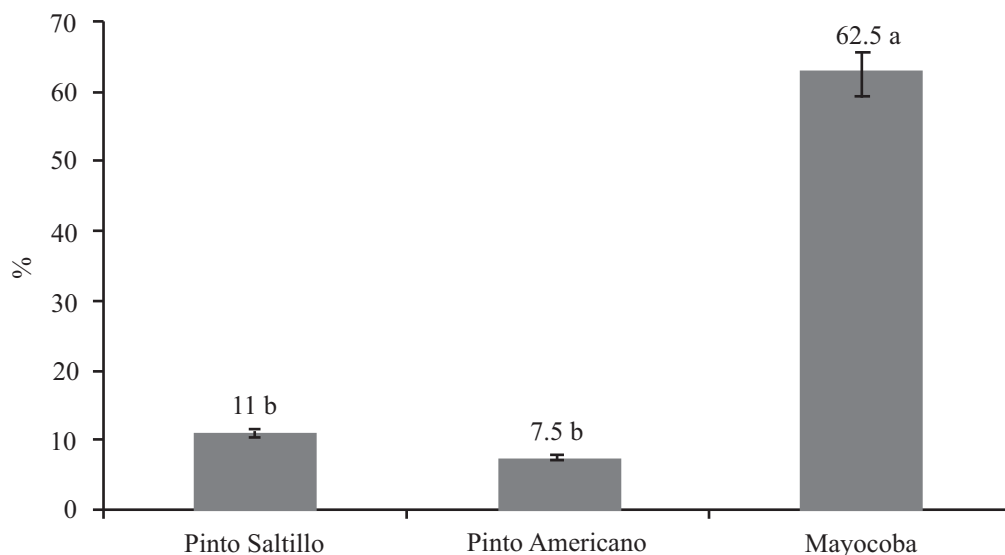
La variedad Mayocoba fue significativamente ($P = 0.05$) más afectada por muerte pre y posemergente (62.5 %), con respecto al 11 y 7.5 % de incidencia identificada en Pinto Saltillo y Pinto americano, respectivamente (Figura 1). La severidad del tizón común fue significativamente menor ($P = 0.05$) en Mayocoba, en la fase de prefloración (Figura 2). En la fase de floración, las tres variedades registraron el mismo nivel de severidad. La virosis fue moderada en general en los tres materiales genéticos y en las dos etapas de evaluación. El daño por chicharrita, aunque moderado fue significativamente menor en la variedad Mayocoba durante la fase de floración (Figura 3); pero esta variedad presentó una clorosis férrica significativamente mayor (Figura 4). Lo anterior, indica que esta última variedad tiene una alta susceptibilidad a la deficiencia férrica, provocada por la indisponibilidad de Fe que se produce en suelos alcalinos (Ortiz-Villanueva y Ortiz, 1990), lo cual es una característica muy generalizada en la región de estudio (Martínez *et al.*, 2000). Como complejo fitosanitario (severidad de daño por plagas y enfermedades) no hubo diferencia estadística entre variedades en ninguna de las dos fases fenológicas, lo cual coincide con lo reportado por Pedroza (1996). Respecto al vigor, no hubo diferencias significativas entre las tres variedades.

2000). As a phytosanitary complex (severity of damage by pests and diseases) there was no statistical difference between varieties in either phenological phases, which agrees to Pedroza (1996) reports. As for vigor, there were no significant differences between the three varieties.

The Mayocoba variety was the one with the lowest photosynthetic activity, transpiration and stomatal conductance (Figures 5 and 6), probably due to low chlorophyll content product of iron chlorosis, which was around 2.3 on a scale of 0- 5, compared to those in Pinto Saltillo and Pinto Americano varieties, which were 0.66 and 0.94, respectively. However, because of these responses, Mayocoba variety tended to be more efficient in water usage (Figure 7). This was associated with stomatal closure identified by the lowest conductance and transpiration, similar to Núñez *et al.* (1998) reports, where although it also negatively affects photosynthesis, its efficiency compared to water usage, was higher (Tambussi, 2004). Lastly, there were no significant differences in the leaf temperature of the three varieties.

Effect of edaphic humidity content. The edaphic humidity content increased the pre-and postemergence death (35.7 %) when moisture remained near to PWP, compared to when close to FC (Table 1), which means that a moderate edaphic humidity content above PWP, produces a higher pre-and postemergence death in the different varieties used in this study. Pedroza and Téliz (1992), reported that high moisture contents favored root rot caused by these pathogens under greenhouse conditions.

No damage variation was detected by pests related to edaphic humidity, except for leafhopper, which significantly



Figural. Incidencia por muerte pre y posemergente (asociada a *Rhizoctonia solani* Khun y *Fusarium* sp.) en diferentes variedades de frijol en la etapa de prefloración. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 1. Incidence by pre and post emergent death (related to *Rhizoctonia solani* Khun and *Fusarium* sp) in different bean varieties in the pre-flowering stage. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

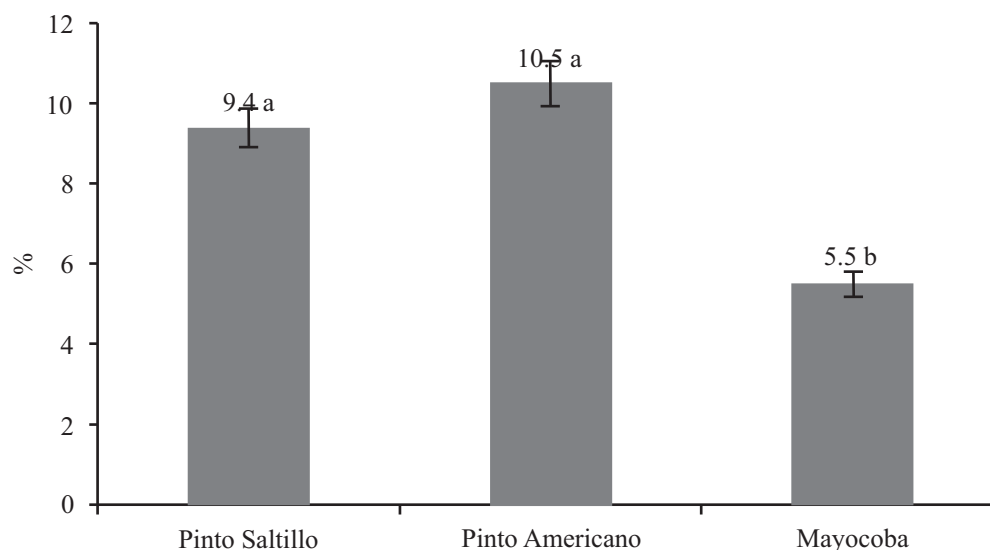


Figura 2. Severidad del tizón común (*Xanthomonas phaesoli*) en diferentes variedades de frijol en la etapa de prefloración. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 2. Severity of common blight (*Xanthomonas phaesoli*) in different varieties of beans in the pre-flowering stage. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letters are not significantly different.

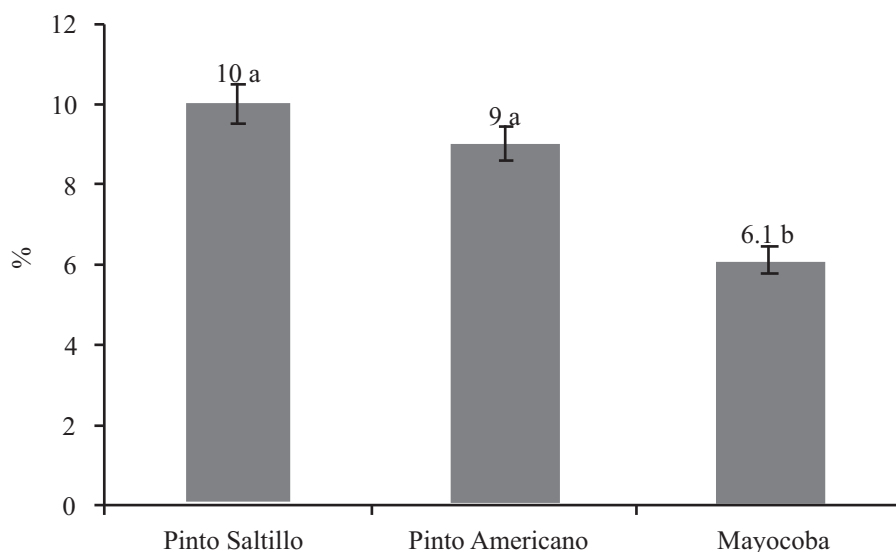


Figura 3. Severidad de daño por chicharrita (*Empoasca kraemeri* Ross y Moore) en diferentes variedades de frijol en la etapa de floración. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 3. Damage severity by leafhopper (*Empoasca kraemeri* Ross and Moore) on different bean varieties in the flowering stage. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

baja actividad fotosintética, transpiración y conductancia estomática (Figura 5 y 6), probablemente debido al bajo contenido de clorofila producto de la clorosis férrica, la cual fue del orden de 2.3 en una escala de 0 a 5, respecto a la manifestada en las variedades Pinto Saltillo y Pinto Americano, que fueron de 0.66 y 0.94, respectivamente. Sin embargo, producto de dicho comportamiento de respuesta, la variedad Mayocoba tendió a ser más eficiente en el uso del

damaged under favorable moisture conditions (FC) at pre-flowering stage, but this effect was lost in the flowering phase. This is explained as a tendency of bigger damage by this pest, under conditions of higher succulence of plant tissues (Pinto *et al.*, 2004), given the higher vigor observed in conditions of moisture close to FC (Tables 1 and 2).

Separated and varieties-content interaction effects of edaphic humidity in plant physiology. The

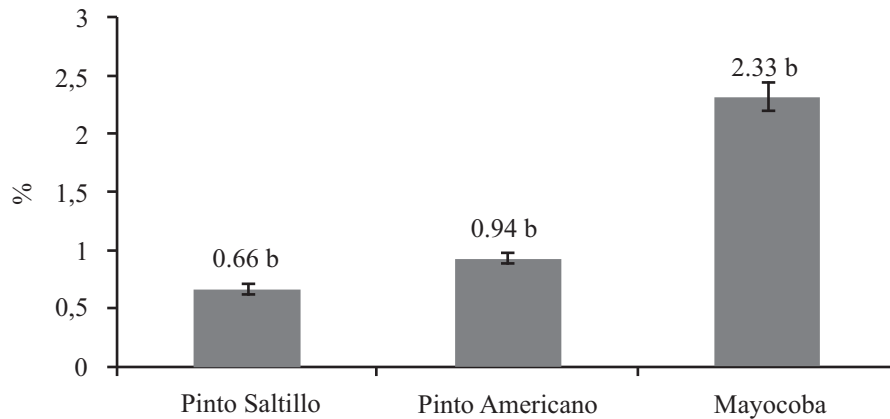


Figura 4. Severidad de la clorosis férrica en diferentes variedades de frijol en la etapa de floración. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 4. Severity of iron chlorosis of different bean varieties in the flowering stage. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

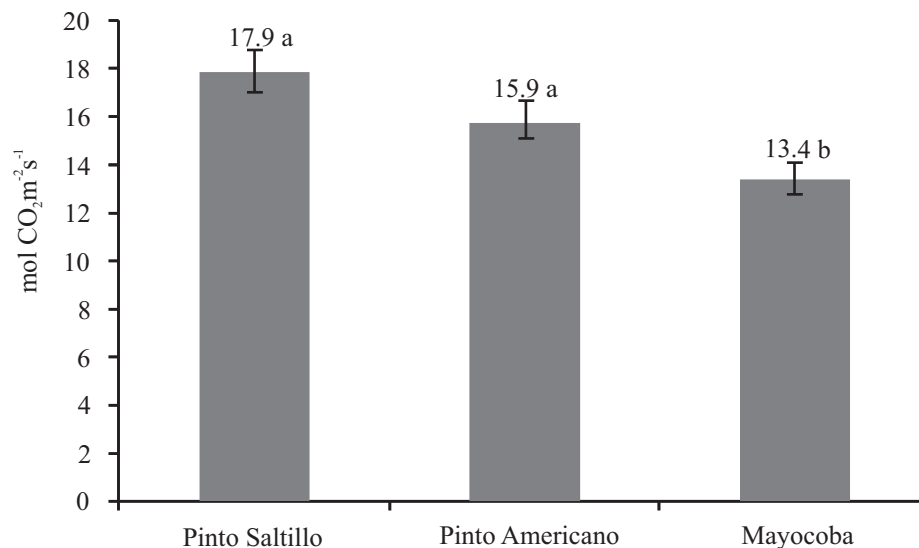


Figura 5. Fotosíntesis en la etapa de floración en tres variedades de frijol. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 5. Photosynthesis in the flowering stage of three bean varieties. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

agua (Figura 7). Lo anterior asociado al cierre estomático identificado por la menor conductancia y transpiración, similar a lo reportado por Núñez *et al.* (1998) que, aunque afecta también negativamente a la fotosíntesis, la eficiencia de ésta en relación al uso del agua, fue mayor (Tambussi, 2004). Finalmente, no hubo diferencias significativas en la temperatura de la hoja entre las tres variedades.

Efecto del contenido de humedad edáfica. El contenido de humedad edáfica influyó significativamente en una mayor muerte pre y posemergente (35.7%) cuando se

photosynthesis rate is not affected by edaphic humidity content, as it is less sensitive than other processes to water stress (RODAS, s/f); although conductance and transpiration are lower when the moisture content is near to PWP. Due to the above, the photosynthetic efficiency is increased at this moisture level, the same as the plant temperature (Table 2 and 3). This suggests that, although there is no variation in photosynthesis, it tends to be more efficient, because of lower transpiration, given the lower conductance, despite increasing temperature of the plant,

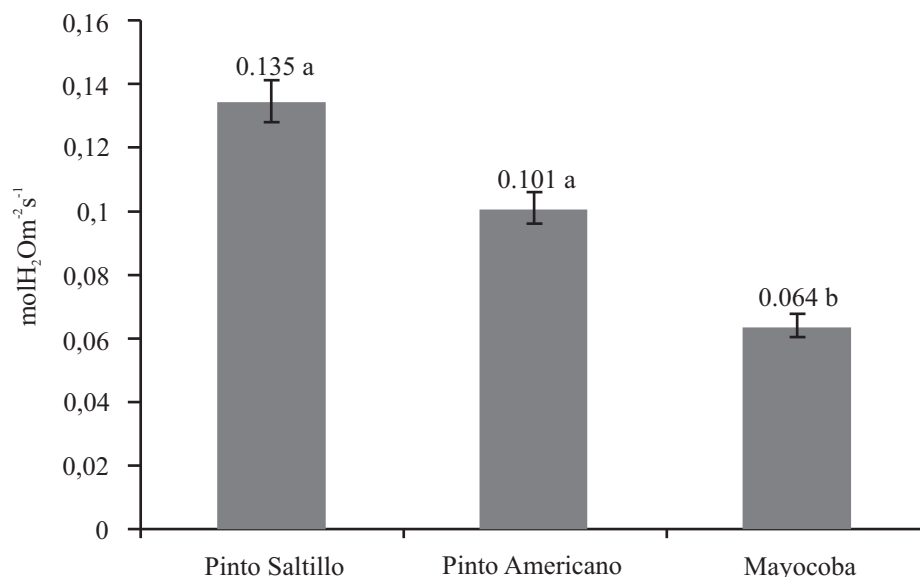


Figura 6. Transpiración en la etapa de floración en tres variedades de frijol. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 6. Transpiration in the flowering stage of three bean varieties. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

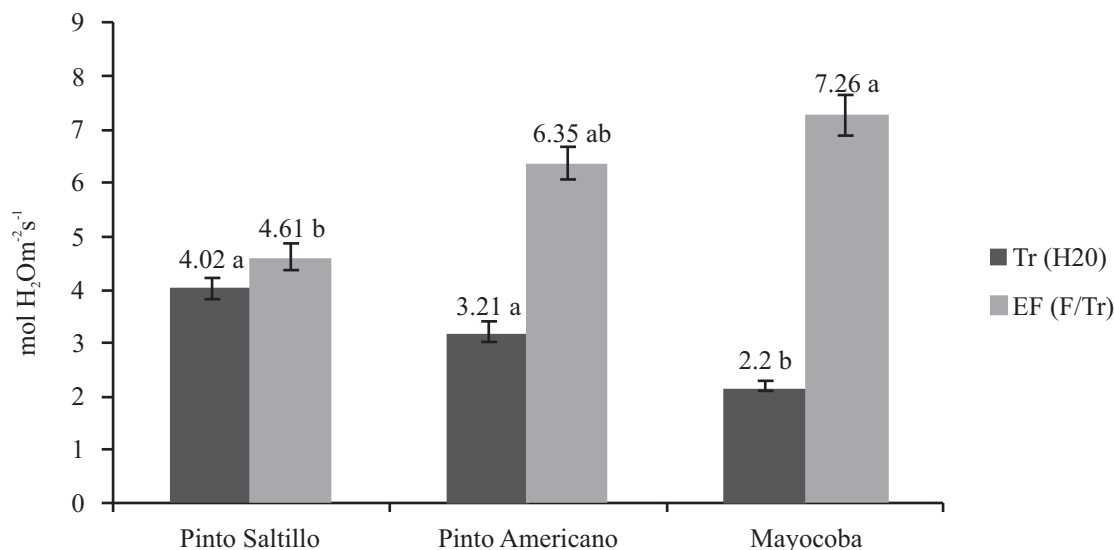


Figura 7. Transpiración y eficiencia fotosintética en la etapa de floración en tres variedades de frijol. Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Medias con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Figura 7. Transpiration and photosynthetic efficiency in the flowering stage of three bean varieties. Tukey test ($\alpha = 0.05$). Means with the same letter are not significantly different.

mantuvo la humedad próxima a PMP, respecto a cuando se mantuvo próxima a CC (Cuadro 1), lo que significa que un contenido de humedad edáfica moderado por encima de PMP, se produce una mayor muerte pre y posemergente en las diferentes variedades utilizadas en el presente estudio. En tanto que Pedroza y Téliz (1992), reportaron que los altos contenidos de humedad, favorecían la pudrición de raíz causada por estos patógenos, en condiciones de invernadero.

No se detectó variación de daños por plagas

which means that although it produces an stomatal closure, photosynthesis is maintained by the possible CO₂ supply through the photorespiration process (Tambussi, 2004; RODAS, s/f.).

The physiological analysis by variety and according to the principles of phylogenetic resistance to stressors: the material that less decreases their agronomical and/or physiological characteristics when going from a favorable edaphic humidity condition (near FC) to an unfavorable humidity condition (near PWP), will be the one with highest

Cuadro 1. Evaluación fitosanitaria en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones óptimas y subóptimas de humedad edáfica en la Comarca Lagunera, México. Etapa de prefloración.

Table 1. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) phytosanitary evaluation under optimal and suboptimal conditions of edaphic humidity at Comarca Lagunera, Mexico. Pre-flowering stage.

Contenido de humedad (%)	Muerte pre y posemerg. (%)	Tizón común (%)	Virosis (%)	Chicharrita (%)	Minador de lahoja (%)	Vigor (0-5)	Clor. Férrica (0-5)	SDPE (%)
CC	21.2 b ± 4.8	8.1 a ± 1.18	5.5 a ± 1.44	7.7 a ± 0.97	4.4 a ± 1.23	4.6 a ± 0.09	1.6 a ± 0.35	56.4 a ± 4.73
PMP	35.7 a ± 5.9	8.7 a ± 0.68	5.4 a ± 1.34	4.4 b ± 1.02	7.0 a ± 1.12	2.9 b ± 0.16	1.5 a ± 0.32	60.4 a ± 4.73

Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, no son estadísticamente diferentes. Los valores \pm debajo de cada valor medio, corresponde al error estándar. CC= Capacidad de campo PMP= Punto de marchitez permanente. SDPE= Severidad de daño por plagas y enfermedades.

asociados a la humedad edáfica, excepto por chicharrita, la cual dañó significativamente más en condiciones de humedad favorable (CC) en fase de prefloración, pero este efecto se pierde en la fase de floración. Lo anterior, se explica como una tendencia de mayor daño por esta plaga, ante condiciones de mayor succulencia de los tejidos de la planta (Pinto *et al.*, 2004), dado el mayor vigor observado en condiciones de humedad próxima a CC (Cuadros 1 y 2).

Efecto por separado y de interacción variedades-contenidos de humedad edáfica en la fisiología de la planta. La tasa de fotosíntesis no se afecta por el contenido de humedad edáfica, ya que es menos sensible que otros procesos al estrés hídrico (RODAS, s/f); aunque la conductancia y la transpiración son menores cuando el contenido de humedad es cercano a PMP. Derivado de lo anterior, la eficiencia fotosintética se incrementa en este nivel de contenido de humedad, lo mismo que la temperatura de la planta (Cuadros 2 y 3). Lo anterior sugiere que, aunque no hay una variación en la fotosíntesis, ésta tiende a ser más eficiente, al haber una menor transpiración, dada la menor conductancia, a pesar de incrementarse la temperatura de la planta, lo cual significa que aunque se produzca un cierre estomático, la fotosíntesis se mantiene gracias al posible suministro de CO₂ por el proceso de la fotorrespiración (Tambussi, 2004; RODAS, s/f.).

El análisis fisiológico por variedad y de acuerdo a los

perspective, since its selection will be based on the average genotype, of both humidity conditions (Pedroza, 1995). Based on this approach, Saltillo Pinto variety is the one that keeps a physiological behavior of higher activity, compared to the other two varieties, in photosynthesis, conductance and transpiration (Figures 8, 9 and 10); although in terms of photosynthetic efficiency, the situation is reversed, where the Mayocoba variety stands as the best in response, while Pinto Saltillo is the less efficient genetic material (Figure 11). This shows that Mayocoba variety has low physiological activity in both conditions, which might be associated with its iron chlorosis (Figure 10). However, it has high potential of photosynthetic efficiency under conditions of water stress, although with a low rate of biomass productivity because of the low photosynthetic activity (Núñez *et al.*, 1998). Pinto Americano showed the highest response stability, which, although with intermediate physiological values between the other two varieties, it did not only maintained its physiological activity from one humidity condition to another, but in some cases it increased when moving to the unfavorable condition, as it was in terms of photosynthetic efficiency and leaf temperature (Figures 8 and 12, respectively). Similar information has been reported previously in relation to the decrease of photosynthetic activity, conductance and transpiration, when decreasing soil moisture but with an

Cuadro 2. Evaluación fitosanitaria en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones óptimas y subóptimas de humedad edáfica en la Comarca Lagunera, México. Etapa de floración.

Table 2. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) phytosanitary evaluation under optimal and suboptimal conditions of edaphic humidity at Comarca Lagunera, Mexico. Flowering stage.

Contenido de humedad (%)	Tizón Común (%)	Virus (%)	Chicharrita (%)	Minador de hoja (%)	Vigor (%)	Clor. Férrica (%)	SDPE (%)
CC	6.6 a ± 0.3	4.8 a ± 1.11	9.3 a ± 1.57	16.4 a ± 1.35	4.6 a ± 0.11	1.1 a ± 0.22	68.5 a ± 4.34
PMP	4.1 a ± 0.19	4.1 a ± 1.02	7.0 a ± 1.4	17.2 a ± 1.31	3.9 b ± 0.12	1.5 a ± 0.19	59.3 a ± 4.46

Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, son estadísticamente iguales. Los valores \pm debajo de cada valor medio, corresponde al error estándar. CC= Capacidad de campo PMP= Punto de marchitez permanente. SDPE= Severidad de daño por plagas y enfermedades.

Cuadro 3. Evaluación fisiológica en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones óptimas y subóptimas de humedad edáfica en la Comarca Lagunera, México. Etapa de floración.

Table 3. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) physiological evaluation under optimal and suboptimal conditions of edaphic humidity at Comarca Lagunera, Mexico. Flowering stage.

Contenido de humedad (%)	Fotosíntesis mol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	Conductancia mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	Transpiración mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	Eficiencia Fotosintética (mol CO ₂ ; mmol H ₂ O)	Temperatura Hoja °C
CC	15.8 a ± 0.69	0.118 a ± 0.01	3.58 a ± 0.31	5.55 b ± 0.64	29.5 b ± 0.24
PMP	15.5 a ± 0.91	0.073 b ± 0.007	2.50 b ± 0.22	6.88 a ± 0.57	30.1 a ± 0.13

Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, nos son estadísticamente diferentes. Los valores \pm debajo de cada valor medio, corresponde al error estándar. CC= Capacidad de campo PMP= Punto de marchitez permanente.

principios de la resistencia filogenética a factores de estrés, aquél material que disminuya menos sus características agronómicas y/o fisiológicas al pasar de una condición de humedad edáfica favorable (próxima a CC) a otra condición de humedad desfavorable (próxima a PMP), será el de mayor perspectiva, dado que su selección se hace en función del genotipo promedio, de ambas condiciones de humedad (Pedroza, 1995). Con este enfoque, la variedad Pinto Saltillo es la que mantiene un comportamiento fisiológico de mayor actividad, respecto a las otras dos variedades, tanto en fotosíntesis, conductancia, como en transpiración (Figuras 8, 9 y 10); aunque en términos de eficiencia fotosintética la situación se invierte, donde la variedad Mayocoba sobresale como la de mejor respuesta, en tanto que la Pinto Saltillo pasa a ser el material genético de menor eficiencia (Figura 11). Lo anterior indica que Mayocoba, tiene una baja actividad fisiológica en ambas condiciones, lo cual puede estar asociado a la clorosis férrica que manifestó (Figura 10). Sin embargo, tiene alto potencial de eficiencia fotosintética ante condiciones de estrés hídrico, aunque con un bajo índice de productividad de biomasa, por la baja actividad fotosintética (Núñez *et al.*, 1998). El Pinto americano fue el que mostró mayor estabilidad de respuesta, el cual, aunque con valores fisiológicos intermedios entre las otras dos variedades, no solamente mantuvo sus actividad fisiológica al pasar de una condición de humedad a otra, sino que en algunos casos las incrementó al pasar a la condición desfavorable, como lo fue en términos de eficiencia fotosintética y en temperatura de la hoja (Figuras 8 y 12, respectivamente). Información similar se ha reportado previamente en relación a la disminución de la actividad fotosintética, conductancia y transpiración, al disminuir la humedad del suelo, pero con un incremento en la eficiencia fotosintética (molCO₂m⁻²s⁻¹: mmolH₂O m⁻²s⁻¹) y el incremento en la temperatura de la planta (French and Turner, 1991; Tezara *et al.*, 1999; Lawlor and Cornic, 2002; Casierra-Posada y Roa, 2006). Lo anterior, posiblemente debido a una mayor actividad metabólica y respiratoria, lo que debe repercutir en una mayor producción de biomasa y por ende de rendimiento (Núñez, *et al.* 1998), sin que ello signifique una pérdida significativa de su tolerancia al estrés hídrico. En resumen, la variedad Pinto Americano es la de

increase in photosynthetic efficiency (molCO₂m⁻²s⁻¹: mmolH₂O m⁻²s⁻¹) and an increase in the plant temperature (French and Turner, 1991; Tezara *et al.*, 1999; Lawlor and Cornic, 2002; Casierra-Posada and Roa, 2006). This might be possible due to an increase in metabolic and respiratory activity, which could result in a higher biomass production and hence yield (Núñez, *et al.*, 1998), without implying a significant loss of tolerance to water stress. In summary, Pinto Americano variety is the one with higher tolerance to pests and diseases and water stress.

CONCLUSIONS

The main pests attacking beans were: planthopper (*Empoasca kraemeri* Ross and Moore) and leafminer (*Xenochalepus signaticollis* Baly); while the most common diseases were: the pre and post-emergence death (associated to *Rhizoctonia solani* Kuhn and *Fusarium* sp.), common blight (*Xanthomonas phaseoli*) and bean common mosaic virus (BCMV), with a 58.4 % average of damage severity.

The pre and post-emergence death significantly increased (35.7 %) when edaphic humidity content was close to PWP.

In general, plants grown at a soil moisture content near to PWP, showed a significantly lower conductance and transpiration, and higher photosynthetic efficiency.

Pinto Americano variety was the best prospect because of its higher photosynthetic efficiency under water deficit and presence of pests and diseases.

LITERATURA CITADA

- Casierra-Posada, F., y Roa, H.A. 2006. El déficit hídrico moderado en el suelo sobre el crecimiento y distribución de materia seca en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss). Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 9: 169-180.
- Cobarruvias, y Velázquez, R. 2010. Manejo integrado fitosanitario de plagas y enfermedades del frijol en Zacatecas. INIFAP-Centro de Investigación Regional Norte. Folleto No. 24.
- CONAFOR. 2012. Sequía en terrenos forestales de México. Recuperado de: www.inegi.org.mx/.../2012/sequias.../P1_003JORGELUISGARCIA.pdf (consulta,

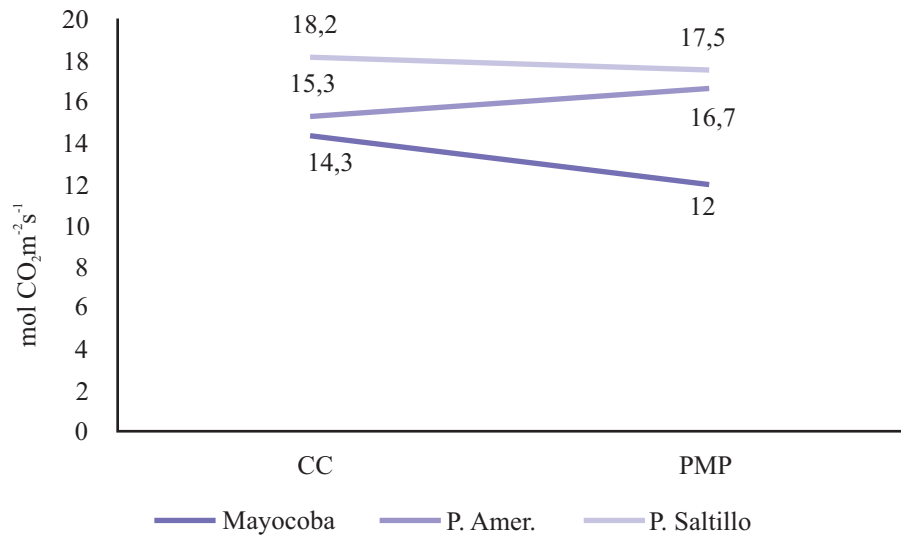


Figura 8. Fotosíntesis en la etapa de floración en diferentes variedades de frijol, al pasar de una condición favorable de humedad edáfica (CC) a una desfavorable (PMP).
 Figura 8. Photosynthesis in the flowering stage of different bean varieties when going from a favorable edaphic humidity condition (FC) to an unfavorable one (PWP).

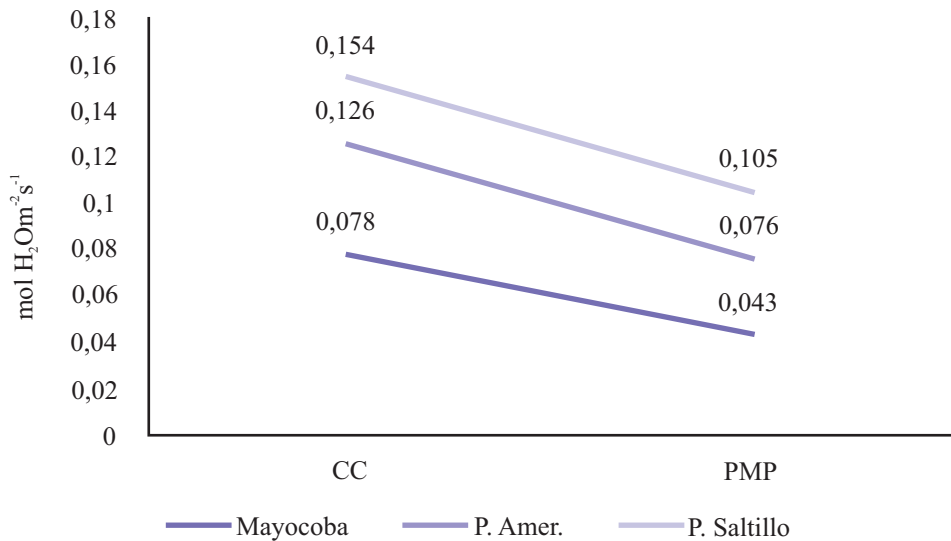


Figura 9. Conductancia estomática en la fase de floración en diferentes variedades de frijol, al pasar de una condición favorable de humedad edáfica (CC) a una desfavorable (PMP).
 Figura 9. Stomatal conductance in the flowering stage of different bean varieties when going from a favorable edaphic humidity condition (FC) to an unfavorable one (PWP).

mayor perspectiva en términos de tolerancia a las plagas y enfermedades y al estrés hídrico.

CONCLUSIONES

Las principales plagas del frijol fueron la chicharrita (*Empoasca kraemeri* Ross y Moore) y el minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis* Baly); en tanto que, las enfermedades fueron la muerte pre y pos-emergente

04 abril, 2014).
 CONANP. 2006. Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Mapimí. Primera Edición. SEMARNAT/CONANP. México D. F. 178 pp.
 French, R.J., and Turner, N.C. 1991. Water deficit change dry matter partitioning and seed yield in narrow-leaved lupins (*Lupinus agustifolius* L.) Australian Journal Agriculture Research 42: 471-484.

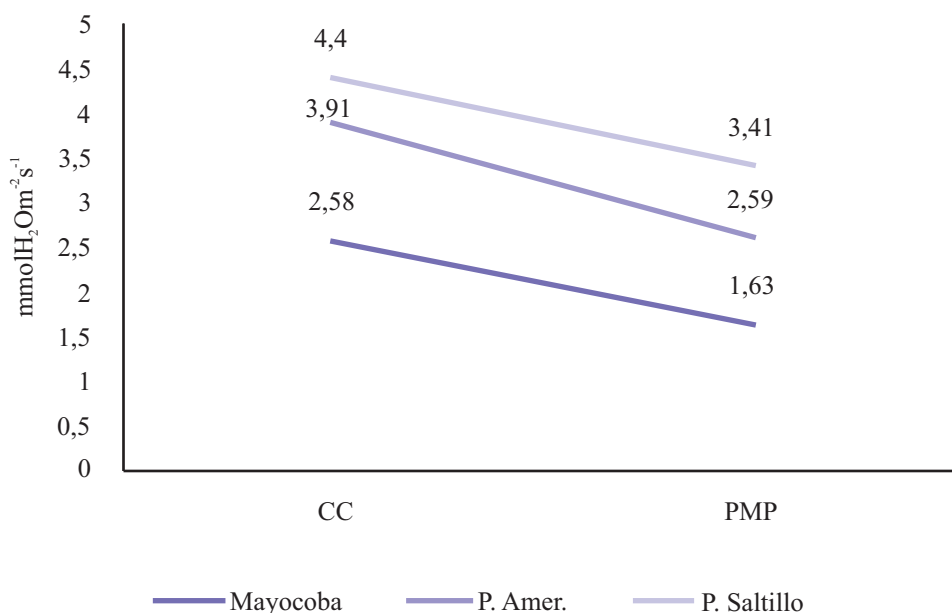


Figura 10. Transpiración en la etapa de floración en diferentes variedades de frijol, al pasar de una condición favorable de humedad edáfica (CC) a una desfavorable (PMP).

Figura 10. Transpiration in the flowering stage of different bean varieties when going from a favorable edaphic humidity condition (FC) to an unfavorable one (PWP).

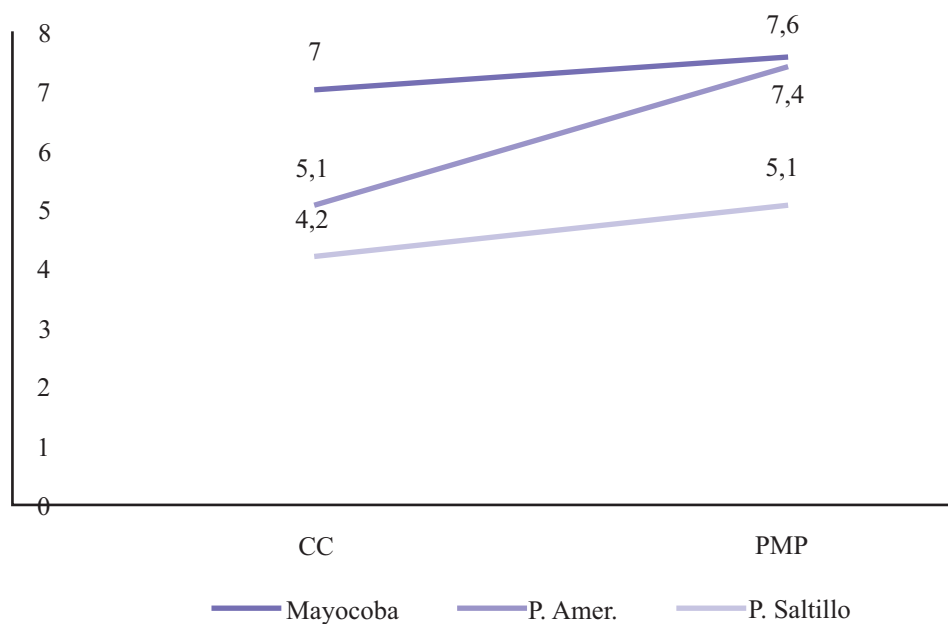


Figura 11. Eficiencia fotosintética (Tr/F) en la etapa de floración en diferentes variedades de frijol, al pasar de una condición favorable de humedad (CC) a una desfavorable (PMP).

Figura 11. Photosynthetic efficiency (Tr/ F) in the flowering stage of different bean varieties when going from a favorable humidity condition (FC) to an unfavorable one (PWP).

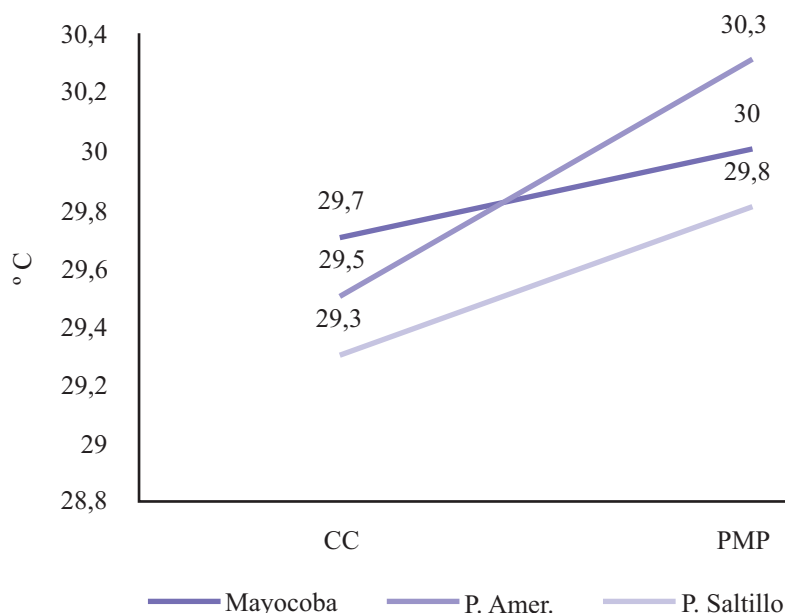


Figura 12. Temperatura de la planta en la etapa de floración en diferentes variedades de frijol, al pasar de una condición favorable de humedad edáfica (CC) a una desfavorable (PMP).

Figure 12. Temperature of the plant in the flowering stage of different bean varieties when going from a favorable edaphic humidity condition (FC) to an unfavorable one (PWP).

(asociada a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.), tizón común (*Xanthomonas phaseoli*) y el virus mosaico común del frijol (BCMV), con una severidad de daño promedio del 58.4 %.

La muerte pre y pos-emergente se incrementó significativamente (35.7 %) cuando el contenido de humedad edáfica fue próxima a PMP.

En general, las plantas desarrolladas a un contenido de humedad del suelo cercano a PMP, registraron una conductancia y transpiración significativamente menores y mayor eficiencia fotosintética.

La variedad Pinto Americano fue la de mejor perspectiva por su mayor eficiencia fotosintética en condiciones de déficit hídrico y presencia de plagas y enfermedades.

García, E. 1973. Apuntes de Climatología. Universidad Autónoma de México. 155 p

Gavander, S.A. 1991. Física de suelos. Principios y aplicaciones. 8ª Edición. Ed. Limusa, S.A. México, D.F. 351 pp.

Guzmán, S.E., García, S. J. A., Mora, F.J.S., Fortis, Valdivia, H. R., y Portillo, V. M. 2006. La demanda de agua en la Comarca Lagunera, México. *Agrociencia* 40: 793-804.

Lambers, H., F.S. Chapin III and T.L. Pons. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, Berlin, 540 p.

Lawlor, D.W., and Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment* 25: 275-294.

Manríquez, N.J.A. 2012. Panorama del frijol en 2012. Recuperado de: URL: economics.com.mx/columnas/agro-negocios/.../panorama-frijol-2012 (consultla, 15 octubre, 2013)

Martínez-Rodríguez, O.A., Gómez-Gallegos, C., y Santamaría-Cesar, E. 2000. Aplicación de quelatos para corregir la deficiencia de hierro en durazno (*Prunus persica* Battch). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* p. 63-69.

Núñez, B.A., Ritchie, J., y Smucker, A.J.M. 1998. El efecto de la sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en el frijol común. *Agronomía Mesoamericana* 9: 1-8.

Ortíz-Villanueva, B., y Ortíz, S.C. 1990. Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. 394 pp.

Pedroza, S.A. 1995. El déficit hídrico en las plantas. Principios y técnicas de manejo. Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. 162 pp.

Pedroza, S.A., y Samaniego, G.A. 2003. Efecto del subsuelo, materia orgánica y diferentes variedades en el patosistema del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 272-280.

Pedroza, S.A. y Téliz, O.D. 1992. Patogenicidad relativa de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp y *Macrophomina phaseolina* en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 10:134-138.

Pedroza, S.A. 1996. Evaluación de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al patosistema de la región de

- Bermejillo, Dgo. Revista Mexicana de Fitopatología 14: 25-30.
- Pedroza, S.A. y Durán, B.S. 2005. Efecto del acolchado plástico, fertilización nitrogenada y composta orgánica en el crecimiento y desarrollo de la sábila *Aloe barbadensis* M. con riego por goteo automatizado. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 4: 1-7.
- Pinto, V.M., Cruz, P.O., Ramírez, A.S., Solís, A.J.F. y Castillo, M.L.E. 2004. Evaluación de alternativas para el manejo integrado de plagas del frijol ejotero en Chapingo, México. Revista Fitotecnia Mexicana 27: 385-389.
- Richards, L.A. 1948. Porous plate apparatus for measuring moisture retention and transmission by soil. Soil Science 66:105-110.
- RODAS. s/f. Efecto del estrés hídrico en plantas. Recuperado de: URL: rodas.us.es/file/4949d71b-4d3d.../1/...estres_hidrico.../pagina_04.htm (consulta, 03 abril, 2014).
- SAGARPA. 2013. Sistema Producto Frijol. Recuperado de: www.sisprofrijol.org.mx/2012/frijol.php?sec=origen (consulta, 22 abril, 2014)
- Tambussi, E.A. 2004. Fotosíntesis, Fotoprotección, Productividad y Estrés abiótico: Algunos casos de estudio. Divisó de Ciéncies Experimentals: Matematiques. Facultat de Biología. Departament de Biología Vegetal. Universitat de Barcelona. 203 pp.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S.D., and Lawlor, D.W. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature 140: 914-917.

Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuosa de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*

Antifungal Activity *in vitro* of the Aqueous Extracts of Spice's Against *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger*

Isaura Cáceres Rueda de León, Rafael Colorado Vargas, Erika Salas Muñoz, Laila N. Muñoz Castellanos, León Hernández Ochoa, Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Universitario # 2, Chihuahua, Chihuahua, Apartado Postal 669, CP 31125, México. Correspondencia: lhernandez@uach.mx

(Recibido: Junio 21, 2013 Aceptado: Marzo 12, 2014)

Cáceres Rueda de León I, Colorado Vargas R, Salas Muñoz E, Muñoz Castellanos LN y Hernández Ochoa L. 2013. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosa de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 105-112.

Resumen. En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosa de especias de clavo (*Eugenia caryophyllata*) canela (*Cinnamomum zeylanicum*); y orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) obtenidos mediante la técnica de hidrodestilación, contra seis de los principales hongos patógenos que atacan a los alimentos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó utilizando la técnica de inhibición del crecimiento micelial y los componentes principales de los extractos acuosa obtenidos se evaluaron por HPLC. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto acuosa de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio con una concentración de 40 mg/L. Los principales constituyentes identificados en los extractos acuosa de las especies estudiadas fueron ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos volátiles (Eugenol, Timol y Carvacrol).

Palabras clave adicionales: Extractos acuosa, actividad antifúngica, hongos patógenos, clavo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

El tema de seguridad de alimentos con relación a la contaminación microbiana, la cual proviene, principalmente de hongos y bacterias, representa un reto en la actualidad

Abstract. In the present study the antifungal activity *in vitro* of the aqueous extracts of clove (*Eugenia caryophyllata*) cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) obtained by hydrodistillation process were evaluated, against six major pathogenic fungi that cause diseases in food (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determinate by inhibition of mycelia growth and the principal compounds contained in the aqueous extracts were analyzed by HPLC. The results showed that the aqueous extracts of Mexican oregano showed major inhibition of mycelia growth with a 40mg/L. The principal constituents identified in the spice extracts were phenolic acids, flavonoids, and volatile compounds (Eugenol, Thymol and Carvacrol).

Additional keywords: Aqueous extracts, antifungal activity, pathogenic fungi, clove (*Eugenia caryophyllata*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*).

Currently, food safety in relation to microbial contamination (which comes mainly from fungi and bacteria) is a big challenge because of the high consumer demand for replacing chemical preservatives as some of them have shown to have carcinogenic effects on health; one possible solution to this problem are the natural products (Falerio *et al.*, 2005; Nutch *et al.*, 2006). It has been shown that a wide variety of plants contain natural compounds, which have antioxidant, anti-cancer and anti-microbial activity, among others (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007). These compounds are known as antimicrobial agents and may be intentionally added to the food or packaging, because they delay growth or kill microorganisms, thus increasing the resistance of adulteration or food safety (Davidson and

debido a la alta demanda de los consumidores para la sustitución de conservadores químicos debido a que algunos de ellos han demostrado tener efectos cancerígenos en la salud; una solución a esta problemática son los productos naturales (Falerio *et al.*, 2005; Nutchá *et al.*, 2006). Se ha demostrado que una gran variedad de plantas contienen compuestos naturales, los cuales presentan actividad antioxidante, anti cancerígena, así como antimicrobiana, entre otras (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007); Estos compuestos son llamados agentes antimicrobianos y pueden ser añadidos intencionalmente al alimento o a empaques, debido a que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos aumentando así, la resistencia de la alteración de calidad o seguridad de un alimento (Davidson y Zivanovic, 2003); en estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de conservadores de alimentos de una manera natural y sin comprometer la salud de los consumidores (Beuchat, 2001); esto, debido a que varios de los agentes antimicrobianos han demostrado tener actividad biológica, la cual puede provenir de sus diversos componentes fenólicos presentes (Zhen-Dan *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2005; Cha y Chinnan, 2004). Para extraer dichos compuestos también es necesario el desarrollo de técnicas que permitan la obtención de éstos, como es el caso de la hidrodestilación (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012) proceso por el cual, se obtienen los aceites esenciales que han sido ampliamente estudiados por su actividad biológica (Lambert *et al.*, 2001). Los aceites esenciales contienen hasta un 3 % de moléculas activas (Ortuño, 2006) sin embargo, su fuerte olor y sabor, en la mayoría de los casos, impide la aceptación de los consumidores. En el proceso de extracción de los aceites esenciales, existe una segunda fase, llamada extracto acuoso o agua floral, la cual, según recientes estudios, puede presentar actividad biológica contra diferentes tipos de bacterias, incrementando las expectativas para su utilización como conservador natural en alimentos, ya que algunos de los componentes activos contenidos en el aceite esencial pueden migrar hacia el extracto acuoso (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012). Estudios de extractos acuosos de plantas, obtenidos por distintos métodos, ya se han utilizado recientemente para la producción de fungicidas alimentarios, incluyendo extractos de pino (*Pinus sylvestris*) abeto rojo (*Picea abies*), ajo (*Allium sativum*), albahaca, romero, laurel entre otros (Eslaminejad *et al.*, 2012; Özcan *et al.*, 2011). En el presente trabajo se investigó la actividad antifúngica y composición química de extractos acuosos de clavo, canela y orégano mexicano para la inhibición de seis de los principales hongos patógenos en alimentos: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium digitatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia vegetal. Se utilizaron partes de tallo, hojas y flores de la planta de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) cultivada en la región de Chihuahua. Los frutos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo (*Eugenia caryophyllata*) fueron adquiridos en la empresa Comercial Cardona S.A. de la misma ciudad; todas las muestras fueron

Zivanovic, 2003); in natural state, these compounds may play the role of food preservatives in a natural way without compromising the consumers health (Beuchat, 2001); a number of antimicrobial agents have shown biological activity, which may come from their various phenolic components (Zhen-Dan *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2005; Cha y Chinnan, 2004). In order to extract these compounds it is necessary to develop extraction techniques, such as hydrodistillation (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012), that is an essential oils extraction process which have been extensively studied because of their biological activity (Lambert *et al.*, 2001). Essential oils contain up to 3% of active molecules (Ortuño, 2006), however, its strong smell and taste, in most cases, avoids the consumer acceptance. During the extraction of essential oils process exists a second phase, called aqueous extract or floral water, which, according to recent studies, may have biological activity against different types of bacteria, increasing the expectations for its use as a natural preservative in food, because some of the active compounds contained in the essential oil can migrate to the aqueous extract (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012). Studies of aqueous plant extracts obtained by different methods, have recently been used for the production of food fungicides, including pine extracts (*Pinus sylvestris*), Norway spruce (*Picea abies*), garlic (*Allium sativum*), basil, rosemary and laurel, among others (Eslaminejad *et al.*, 2012; Özcan *et al.*, 2011). In this study, the antifungal activity and chemical composition of aqueous extracts of clove, cinnamon and Mexican oregano were tested for the inhibition of six major pathogens present in food: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*.

MATERIALS AND METHODS

Plan material. Parts of the stem, leaves and flowers of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) cultivated in the region of Chihuahua were used. The cinnamon fruits (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Eugenia caryophyllata*) were obtained from Comercial Cardona S.A. Company in the same city; all samples were from the same batch and stored at room temperature (27±2 °C).

Biological material. Three of the strains used (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger*) were obtained from the culture collection of the Faculty of Chemistry. *Alternaria alternata* was isolated from saladette tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepper (*Capsicum annum* L.), both in decomposition process with remarkable cuticular damage; *Geotrichum candidum* was isolated from panela cheese and *Penicillium digitatum* was obtained from Capulin (*Ardisia compressa*); all strains were isolated according to Agrios (2005); once the cuticular damage was identified in the products, three deep triangular cuts were made with a scalpel of approximately 0.5 cm depth in external necrosis areas, then they were disinfested in a 2% sodium hypochlorite solution for 30 sec, then 3 washes with sterile water, and lastly, they were placed on sterile gauze to remove water excess. Samples were seeded in PDA (potato-dextrose agar Bioxon BD) agar and

provenientes del mismo lote y almacenadas a temperatura ambiente (27±2 °C).

Material biológico. Tres de las cepas utilizadas (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. y *Aspergillus niger*) fueron obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas. *Alternaria alternata* fue aislado de jitomate tipo saladette (*Lycopersicon esculentum*) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) ambos en proceso de descomposición con daño cuticular notable; *Geotrichum candidum* se aisló de queso tipo panela y *Penicillium digitatum* se obtuvo del Capulín (*Ardisia compressa*); todas las cepas fueron aisladas de acuerdo a lo publicado por Agrios (2005); una vez identificado el daño cuticular en los productos se realizaron cortes profundos y triangulares con un bisturí de una profundidad de aproximadamente 0.5 cm en las zonas de necrosis externa, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 30 seg y después recibieron 3 lavados con agua esteril, finalmente se colocaron en gasas estériles para retirar el exceso de agua. Las muestras fueron sembradas en agar PDA (papa-dextrosa-agar BD Bioxon) y posteriormente identificadas morfológicamente de acuerdo al manual de Barnett y Hunter (1998).

Hidrodestilación. Las especias se sometieron individualmente al proceso de hidrodestilación utilizando un aparato modificado de extracción tipo Schilcher, con una relación de 1/10 (p/v) según lo publicado por Hernández-Ochoa *et al.*, 2012. La extracción tuvo una duración total de 5 h, y al final del proceso se recuperaron los extractos acuosos en frascos color ámbar para evitar la oxidación, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.

Determinación de la concentración. Se realizó mediante una separación líquido-líquido (extracto/acetato de etilo) en un embudo, en una relación 1:2 (v/v). La fase orgánica de este proceso se llevó a un rotavapor y la determinación de la concentración se realizó mediante la diferencia de pesos del matraz con la ecuación 1:

$$ppm = \frac{mg}{L} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde ppm son las partes por millón.

Determinación de la Composición Química mediante HPLC. El equipo utilizado fue un Sistema HPLC Dionex (P680 Solvent Rack SOR-100) unido a una bomba doble para solventes y un detector UV; con columna C-18 Varian Polaris 5 (5 µm, 250 x 4.6 mm) con un flujo de 0.8 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL siendo filtradas las muestras con filtros de 0.2 µ antes de ser inyectadas. La detección se llevó a cabo a 280 nm. Los compuestos fenólicos obtenidos de las 3 diferentes especias se analizaron mediante el método descrito por Shan *et al.* (2005), el cual consiste en un programa de gradientes entre dos diferentes soluciones: ácido fórmico al 2.5 % (solución A) y metanol 100 % (solución B). Estándares comerciales para la identificación fueron utilizados: ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido cinámico y ácido hidroxycinámico), cinamaldehído, acetil eugenol, alcohol cinámico, ácido p-coumarico, eugenol, quercetina, acetato

later morphologically identified according to the Barnett and Hunter (1998) manual.

Hydrodistillation. Spices were individually hydrodistilled using a modified Schilcher extraction apparatus, with a 1/10 (w/v) ratio as published by Hernández-Ochoa *et al.* (2012). Extraction lasted a total of 5 h, and the end of the process the aqueous extracts were recovered in amber vials to avoid oxidation, the samples were stored under refrigeration at 4 °C.

Determination of concentration. This calculation was done by liquid-liquid separation (extract/ethyl acetate) in a funnel, in a 1:2 ratio (v/v). The organic phase of this process was transferred to a rotary evaporator and the concentration estimation was done by the weight difference of the flask with equation 1:

$$ppm = \frac{mg}{L} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Where ppm are the parts per million.

Determination of Chemical Composition by HPLC. The equipment used was a Dionex HPLC system (P680 Solvent Rack SOR-100) with a double pump for solvent and a UV detector; C-18 column Varian Polaris 5 (5 µm, 250 x 4.6 mm) with a 0.8 mL/min flow rate and 20 µL injection volume filtered with 0.2 µ filters before injection. The detection was done at 280 nm. The phenol compounds obtained from the 3 different spices were analyzed by the method described by Shan *et al.* (2005), which consists of a gradient program of two different solutions: 2.5 % formic acid (solution A) and 100 % methanol (solution B). For the identification, commercial standards were used: phenolic acids (rosmarinic acid, cinnamic acid, and hydroxycinnamic acid), cinnamaldehyde, eugenol acetyl, cinnamic alcohol, p-coumaric acid, eugenol, quercetin, eugenol acetate, caryophyllene, gallic acid, catechin, epicatechin, thymol, carvacrol, vanillic acid, caffeic acid, p-cymene, chlorogenic acid, kaempferol and rosmarinic acid. All identification analyzes were performed in triplicate. A wide wave length was used to identify different types of polyphenols and all samples were stored at 4 °C.

Biological activity of aqueous extracts. CMI was determined according to the methodology described by Carrillo *et al.* (2003) in PDA cultures with ten different extract concentrations: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 ppm. Each of the selected fungus were seeded, by using 4 mm diameter discoidal pieces made with a tunneler, taken from a seven days grown colony and placed in the center of the petri dishes with the treatments. The samples were incubated at 27 ± 2°C for seven days and for the recording of the growth, the colony was measured in two perpendicular diameters with a Vernier to calculate the average mycelial growth. Three replicates were done for each treatment and a control, with untreated inoculum for each of the aqueous extracts and concentration tested. Once values close to the minimum inhibitory concentration were determined, the number of tests was reduced and testing in 50 ppm intervals within the range of inhibition, were done. Analysis of variance was performed using the statistical

de eugenol, cariofileno, ácido gálico, catequina, epicatequina, timol, carvacrol, ácido vainillico, ácido cafeico, ρ -cimeno, ácido clorogénico, kaempferol y ácido rosmarínico. Todos los análisis de identificación se realizaron por triplicado. Se utilizó una de longitud onda amplia para identificar diferentes tipos de polifenoles y todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C.

Actividad biológica de extractos acuosos. Se determinó la CMI de acuerdo a la metodología descrita por Carrillo *et al.*, (2003) en cultivos de PDA con diez diferentes concentraciones de extracto: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm. Se sembró cada uno de los hongos seleccionados, utilizando trozos discoidales de 4 mm de diámetro hechos con un horador, tomados de una colonia de siete días de desarrollo y se colocaron en el centro de las cajas petri con los tratamientos. Las muestras se incubaron a 27±2 °C durante siete días y para el registro de su crecimiento se midió la colonia en dos diámetros perpendiculares con un Vernier para poder calcular el promedio del crecimiento del micelio. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, más un testigo, con inoculo sin tratamiento para cada uno de los extractos acuosos y concentraciones probadas. Una vez que se determinaron los valores cercanos a las concentraciones mínimas inhibitorias, se procedió a reducir el número de ensayos y realizar pruebas en intervalos de 50 ppm, dentro del rango de inhibición. Se realizó el análisis de varianza mediante el programa estadístico Minitab versión 15 y las pruebas se establecieron en relación a la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) con tres replicas por muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fisicoquímicos. Los resultados obtenidos para los análisis de pH de los extractos acuosos, mostraron que todos los extractos presentaron valores ácidos, siendo 5.3 ± 0.11 para el clavo, 5.5 ± 0.2 para canela y 6.2 ± 0.11 para orégano presentando diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$). En el caso de la densidad, se obtuvieron valores muy similares a los del agua, con 0.9977 ± 0.0009 para el extracto acuoso de canela, 0.9977 ± 0.0015 para clavo y finalmente 0.9975 ± 0.0002 para orégano, sin significancia entre ellos ($p > 0.05$), éste valor se debe a que los extractos presentan características muy parecidas a las del agua como ser un líquido no viscoso y polar. Las concentraciones finales, posterior a la eliminación del agua de los extractos acuosos obtenidos fueron de 1009.4 mg/L para la canela; 715.5 mg/L para el clavo y finalmente, el orégano con 500 mg/L. Concentraciones similares fueron reportadas por Seori *et al.*, (2011).

Determinación de compuestos principales mediante HPLC. Los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos obtenidos fueron en su mayoría ácido gálico, flavonoides (catequina y kaempferol) y compuestos volátiles como eugenol, timol y carvacrol como se puede observar en la Figura 1, que muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC para: A clavo (*Eugenia caryophyllata*), B orégano mexicano (*Lippia berlandieri*), C canela (*Cinnamomum zeylanicum*); detectados a 280 nm. Los resultados obtenidos muestran que, de la misma manera

software Minitab version 15 and the tests were established in relation to the Tukey means comparison ($p < 0.05$) with three replicates per sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical analysis. The results obtained for pH analysis of aqueous extracts showed that all extracts were acid: 5.3 ± 0.11 for clove, 5.5 ± 0.2 for cinnamon and 6.2 ± 0.11 for oregano with significant differences between them ($p < 0.05$). As for density, very similar to water values were obtained: 0.9977 ± 0.0015 for cinnamon aqueous extract, 0.9977 ± 0.0009 for clove and 0.9975 ± 0.0002 for oregano, without significance between them ($p > 0.05$), this value is due to the extracts similar characteristics to water, like being a non-viscous and polar liquid. The final concentrations, after water removal from the obtained aqueous extracts, were: 1009.4 mg/ L for cinnamon; 715.5 mg/ L for clove and 500 mg/ L for oregano. Similar concentrations were reported by Seori *et al.*, (2011).

Determination of main compounds by HPLC. The major phenolic compounds present in the aqueous extracts obtained, were mainly gallic acid, flavonoids (catechin and kaempferol) and volatile compounds such as eugenol, thymol and carvacrol. Figure 1 shows the obtained HPLC chromatograms of: A clove (*Eugenia caryophyllata*), B Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), C cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); detected at 280 nm. Results obtained showed that, in the same way that in the essential oil (obtained from the hydrodistillation process, in which the aqueous extract is separated) analyzed by gas chromatography, the main compounds in the essential oils are the same that migrated to the aqueous phase, keeping their majority proportions, this may be due to the fact that hydrophilic extracts have proven to be one of the best solvents for molecules such as polyphenols (Suresh *et al.*, 2011). Figure 1A shows the determined chemical composition for the clove aqueous extract, where its main compound identified was eugenol. Also some flavanols, such as catechin and kaempferol, were identified, as well as some traces of chlorogenic acid and ρ -cymene. In the case of oregano aqueous extract, the results obtained showed that it tends to accumulate in its chemical composition higher concentrations of thymol than carvacrol, as shown in Figure 1B, these results are very similar to those reported by Rivero-Cruz *et al.*, (2011), in which they mention that thymol and carvacrol isomers, as well as ρ -cymene are the main constituents of the aqueous extract of the Mexican oregano *Polimintia longiflora* and *Lippia graveoles*. In the cinnamon aqueous extract (*Cinnamomum zeylanicum*) analyzed in this study (Figure 1C), it was determined the presence of cinnamaldehyde as the main component, and Kaempferol in lower proportion and traces of cinnamic alcohol, these results are similar to those obtained by Shan *et al.*, (2005).

Biological activity of aqueous extracts. Minimum inhibitory concentrations of the three extracts used against the six types of fungi studied, were determined. The results obtained are shown in Table 1, where it is possible to observe that the oregano aqueous extract, had the highest biological

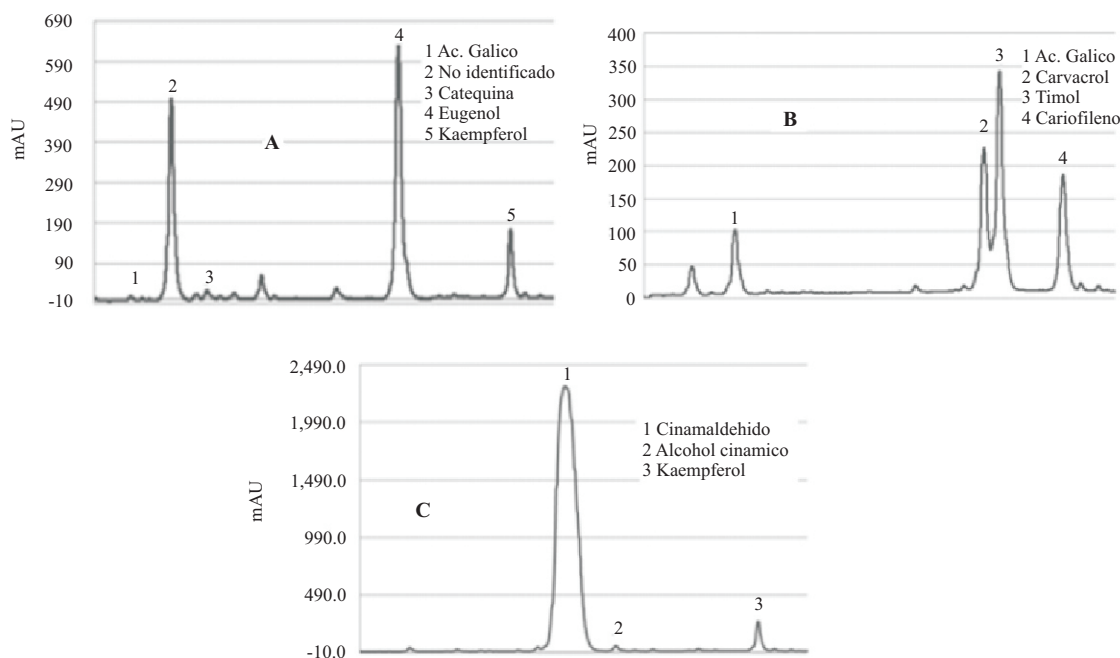


Figura 1. Comatogramas obtenidos de los extractos acuosos de **A:** clavo (*Eugenia caryophyllata*), **B:** orégano mexicano (*Lippia berlandieri*), **C:** canela (*Cinnamomum zeylanicum*); detectados a 280 nm por HPLC.

Figure 1. Chromatograms obtained from the aqueous extracts of **A:** clove (*Eugenia caryophyllata*), **B:** Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), **C:** cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); detected at 280 nm by HPLC.

que en el aceite esencial (obtenido en el proceso de hidrodestilación por el cual se separa el extracto acuoso) analizado mediante técnicas de cromatografía de gases, los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales son los mismos que lograron migrar hacia la fase acuosa, manteniendo sus proporciones mayoritarias, esto se puede deber a que los extractos hidrofílicos han demostrado ser uno de los mejores solventes para moléculas como los polifenoles (Suresh *et al.*, 2011). La figura 1A, muestra la composición química determinada para el extracto acuoso de clavo, donde su principal compuesto identificado fue eugenol. También se identificaron algunos flavonoles como la catequina y kaempferol, y se pudo mínimamente detectar trazas de ácido clorogénico así como ρ -cimeno. En el caso del extracto acuoso de orégano, los resultados obtenidos mostraron que tiende a acumular en su composición química concentraciones más altas de timol que de carvacrol, como lo muestra la figura 1B, estos resultados son muy similares a los obtenidos por Rivero-Cruz *et al.*, (2011) en los cuales mencionan que los isómeros timol y carvacrol, así como ρ -cimeno son los compuestos mayoritarios del extracto acuoso del orégano mexicano *Polimintia longiflora* y *Lippia graveoles*. En el extracto acuoso de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) analizado en el presente estudio (Figura 1C) se determino la presencia de Cinamaldehido como compuesto mayoritario y en menor proporción de Kaempferol, así

activity against the studied fungi, as it demonstrated higher inhibition of fungi and it slowed the growth in virtually all cases. Oregano aqueous extract confirmed high biological fungistatic and fungicidal activity for the species *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger*, showing complete inhibition at 200 ppm, while for *A. alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp. and *Penicillium digitatum* from 250 ppm. It is important to mention that, literature related to the antifungal activity of aqueous extracts of this variety of oregano was not found, so, the results obtained were compared with those reported by Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) on the biological activity of the essential oil and extracts from *Lippia graveonlens*, where it is reported that that oregano extracts were active against *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* and *P. digitatum* at concentrations of 500 $\mu\text{l L}^{-1}$, 4000 $\mu\text{l L}^{-1}$ and 3000 $\mu\text{l L}^{-1}$ respectively. The clove aqueous extract showed biological activity at 800 ppm for all fungi under study. It has been shown that clove essential oil has *in vitro* antifungal activity, affecting species that often develop in foods such as *Paecilomyces*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. and also some *Aspergillus* species (Joseph and Sujatha, 2011) and that significantly inhibits growth of *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. chrysogenum* and *Penicillium* spp., from 500 ppm and 1000 ppm (Kritzing *et al.*, 2002). It is difficult to attribute the biological activity of natural and

como trazas de alcohol cinámico, estos resultados son similares a los obtenidos por Shan *et al.*, (2005).

Actividad biológica de extractos acuosos. Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitoria de los tres extractos acuosos utilizados contra los seis tipos de hongos de estudio, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, en la cual se puede observar que el extracto acuoso de orégano presentó mayor actividad biológica contra los hongos en estudio, demostró tener mayor inhibición de los hongos y reducir la velocidad de crecimiento en casi todos los casos. El extracto acuoso de orégano confirma tener gran actividad biológica fungistática y fungicida tanto para la especie de *Fusarium oxysporum* como para *Aspergillus niger*, mostrando inhibición total a 200 ppm, mientras que para *A. alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp. y *Penicillium digitatum* a partir de 250 ppm. Es importante mencionar que, no se encontraron referencias bibliográficas de la actividad antifúngica de extractos acuosos de esta variedad de orégano, por lo que los resultados obtenidos fueron comparados con los referenciados por Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) sobre la actividad biológica del aceite esencial y extractos obtenidos con solventes de *Lippia graveolens*, en los cuales se menciona que extractos de orégano fueron activos contra *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides*, *P. digitatum* a concentraciones de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$, 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ y 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$ respectivamente. El extracto acuoso de clavo presentó actividad biológica a 800ppm para todos los hongos en estudio. Se ha demostrado que el aceite esencial de clavo posee actividad antifúngica *in vitro*, afectando especies que se desarrollan frecuentemente en los alimentos tales como *Paecilomyces*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., inclusive algunas especies de *Aspergillus* (Joseph and Sujatha, 2011) y que inhibe perceptiblemente el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. chrysogenum*, *Penicillium* spp., a partir de 500 ppm y 1000 ppm (Kritzinger *et al.*, 2002). Es difícil atribuir la actividad biológica de mezclas naturales y complejas como los aceites esenciales y extractos acuosos a un componente particular. Generalmente, los componentes principales se encuentran para reflejar absolutamente bien las características biofísicas y biológicas de los extractos (Bakkali *et al.*, 2008). Sin embargo, es razonable asumir que la actividad fúngica de este extracto se puede relacionar con la presencia de una alta concentración (75-100 %) de *Eugenol*. Los componentes con estructura fenólica como el eugenol son altamente activos contra microorganismos (Gupta *et al.*, 2008). Este compuesto fenólico puede desnaturalizar las proteínas y reaccionar con los fosfolípidos de la membrana celular que cambian su permeabilidad (Bhuiyan *et al.*, 2010), lo cual se explica por la naturaleza ácida del grupo hidroxilo, que forma un puente de hidrógeno con un centro enzimático activo. Generalmente, los componentes principales parecen reflejar absolutamente bien las características biofísicas y biológicas de los aceites esenciales y extractos de los cuales fueron aislados, la amplitud de sus efectos que están dependientes de su concentración cuando fueron probados los aceites y extractos provenientes de una especie, efecto que disminuye

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos acuosos de especias contra hongos fitopatógenos. Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aqueous spice extracts against pathogenic fungi.

	Extractos Acuosos		
	Clavo	Canela	Orégano
<i>Fusarium oxysporum</i>	800	500	200
<i>Alternaria alternata</i>	750	500	250
<i>Geotrichum candidum</i>	750	500	200
<i>Trichoderma</i> spp.	750	500	250
<i>Penicillium digitatum</i>	750	500	200
<i>Aspergillus niger</i>	750	500	200

*Concentración expresada en ppm, los ensayos se realizaron por triplicado

and complex mixtures, such as essential oils and aqueous extracts, to a particular component. Generally, the main components reflect quite well the biophysical and biological properties of the extracts (Bakkali *et al.*, 2008). However, it is reasonable to assume that the fungal activity of this extract may be related to the presence of Eugenol high concentration (75-100 %). Phenolic structure components such as eugenol are highly active against microorganisms (Gupta *et al.*, 2008). This phenolic compound can denature proteins and it reacts with phospholipids of the cell membrane that change their permeability (Bhuiyan *et al.*, 2010), which is explained by the acidic nature of the hydroxyl group, which forms a hydrogen bond with an enzymatic active center. Generally, the main components seem to reflect quite well the biophysical and biological characteristics of the essential oils and extracts from which they were isolated, the extent of their effects depend on their concentration, and their effect decreases when combining plants. Thus, the synergistic functions of several molecules contained in an essential oil or extract, with respect to the action of one or two main components, seems questionable. However, it is possible that the activity of the major components is modulated by other molecules of less importance (Bakalli *et al.*, 2008). The antifungal activity of the Cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) was determined at concentrations of 500 ppm for all fungi used in the study; these results agree with those obtained by Singh *et al.*, (2007) where they determined the biological activity of the essential oil and oleoresins of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) showing the complete mycelial inhibition against *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrium* and *Penicillium viridicatum* at 6 μL . It is important to mention that a specific mechanism of action about how the extracts and essential oils work, is not known; however, a possible explanation is the effect of permeability, because each cell is surrounded by a layer known as permeable membrane, and through this semipermeable membrane each cell can exclude chemicals or let them in, as applicable. This means that, some fungicides are excluded or partially excluded by the semipermeable membrane and others can

al realizar la combinación de plantas. Así, funciones sinérgicas de varias de las moléculas contenidas en un aceite esencial o en extractos, con respecto a la acción de uno o dos componentes principales, parece cuestionable. Sin embargo, es posible que la actividad de los componentes principales, está modulada por otras moléculas de menor importancia (Bakalli *et al.*, 2008). La actividad antifúngica del extracto acoso de Canela (*Cinnamomun zeylanicum*) se pudo determinar a concentraciones de 500 ppm para todos los hongos utilizados en el estudio, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Singh *et al.*, (2007) los cuales determinaron la actividad biológica del aceite esencial y oleorresinas de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) demostrando la completa inhibición micelial contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrium* y *Penicillium viridicatum* a 6 µL. Es importante mencionar que no se conoce un mecanismo específico de acción acerca de cómo funcionan los extractos y aceites esenciales, sin embargo, una de las posibles explicaciones es el efecto de permeabilidad, debido a que cada célula está rodeada por una capa llamada membrana permeable, gracias a esta membrana semipermeable cada célula puede excluir compuestos químicos o bien dejarlos entrar, según sea el caso. Esto significa que, algunos fungicidas quedarán excluidos o parcialmente excluidos por la membrana semipermeable y otros podrán pasar; la membrana ha de contener proteínas y grasas. Por lo que, el compuesto debe poseer grupos solubles en agua y grupos solubles en grasas. La mayor parte de la molécula soluble en agua (grupos polares) se disolverán en la fase exterior proteica de la membrana semipermeable. Luego el grupo soluble en grasas, no polar, se disolverá en la parte central de la membrana. Si el compuesto puede disolverse en ambas partes de esta membrana, tendremos un compuesto capaz de penetrar (Zulueta-Rodríguez *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN

Diferentes tipos de hongos patógenos alimentarios (*F. oxysporum*, *A.alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp., *P. digitatum* y *A.niger*) fueron inhibidos *in vitro* por extractos acuosos de especias obtenidos por hidrodestilación. El extracto acuoso de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio con una concentración de 40 mg/L. La actividad biológica se pudo atribuir a los diferentes compuestos fenólicos encontrados en el análisis de la composición química. Los principales constituyentes identificados en los extractos acuosos de las especies estudiadas fueron ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos volátiles (Eugenol, Timol y Carvacrol).

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Bakalli F, Averbek S, Averbek D, and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology 46:464-475.
- Barnett HL, and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218p.
- Beuchat LR. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. CRC Press. London, U.K. 149-169p
- Bhuiyan N, Begum J, Nandi N, Akter F. 2010. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum*). African Journal of Plant Science 4: 451-454.
- Carrillo JA, Montoya TJ, García RS, Cruz JE, Márquez I, Sañudo A. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici Snyder y Hansen en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:123-127.
- Cha D, Chinnan M. 2004. Biopolymer-Based antimicrobial packaging. Food Science and Nutrition 44: 223-237.
- Davidson PM, Zivanovic S. 2003. The use of natural antimicrobials. En: Food Preservation Techniques (P. Zeuthen y L. Bogh-Sorensen, eds.). Washington, DC, USA. 20-41p
- Eslaminejad P, Maziah Z, Eslaminejad T. 2012. Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) *in vitro*. Microbial Pathogenesis 52:125-129.
- Faleiro L, Graca M, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2005. Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:8162-8168.
- Gupta Ch, Garg AP, Uniyal RC, Kumari A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. African Journal of Microbiology Research

- 2:247-251.
- Hernández-Ochoa L, Macías-Castañeda CA, Nevárez-Moorillón GV, Salas-Muñoz E, Sandoval-Salas F. 2012. Antimicrobial activity of chitosan-based films including spices essential oils and functional extracts. *Journal of food* 10:85-91.
- Jasso de Rodriguez D, Rodriguez-Garcia R, Hernández-Castillo FD, Aguilar-Gonzalez CN, Saenz-Galindo A, Villarreal-Quintanilla, Moreno-Zuccolotto LE. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahua desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Corps and Products* 34:960-966.
- Joseph B, Sujatha S. 2011. Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum*) on some food borne pathogens. *Asian Journal of Biological Sciences* 4:35-43.
- Kritzinger Q, Aveling T, Marasas W. 2002. Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Journal of Seed Science and Technology* 30:609-619.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Nutch S, Anuvat J, Vanee Ch, Panuwat S. 2011. Antimicrobial activity of cinnamon, clove and galangal essential oils and their principal constituents, and possible application in active packaging. *Presentacion the Proceedings of 15th IAPRI World Conference on Packaging*. 2-5 October, Tokyo, Japan.
- Ortuño MF. 2006. Métodos de obtención de aceites esenciales. En: *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones. Murcia, España. 20-62p
- Özcan MM, Fahad Y, AL Juhaimi. 2011. Antioxidant and antifungal activity of some aromatic plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:1361-1366.
- Rivero-Cruz I, Duarte G, Navarrete A, Bye R, Linares E, Mata R. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of Food Science* 76:309-317.
- Seori J, Kyung-Hyun Ch. 2011. Water extract of cinnamon and clove exhibits potent inhibition of protein glycation and anti-atherosclerotic activity in vitro and in vivo hypolipidemic activity in zebrafish. *Food and chemical toxicology* 49:1521-1529.
- Shan B, Yizhong Z, Sun M, Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:7749-7759.
- Singh G, Maurya S, De Lampasona MP, Catalan C. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45:1650-1661.
- Suresh KD, Parmita J, Shyam NJ, Rishi B, Viswas KN. 2013. Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat. *Journal Food Science Technology* 50:555-560.
- Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Zhen-Dan H, Chun-Feng Q, Quan-Bin H, Chuen-Lung Ch, Hong-Xi Xu, Ren-Wang J, Paul Pui-Hay B, Pang-Chui SH. 2005. Authentication and Quantitative Analysis on the Chemical Profile of Cassia Bark (*Cortex Cinnamomi*) by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2424-2428.
- Zulueta-Rodríguez R, Trejo-Aguilar D, Trigos-Landa A. 2007. Maravillosos mundo de los hongos. Editorial Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz, México. 91-102 p.

Estado Actual de *Peronospora sparsa*, Causante del Mildiu Velloso en Rosa (*Rosa* sp.)

Current Status of *Peronospora sparsa*, Causal Agent of Downy Mildew on Rose (*Rosa* sp.)

Pablo Israel Álvarez Romero, Rómulo García Velasco, Martha Elena Mora Herrera, Justino Gerardo González Díaz, Centro Universitario Tenancingo-Universidad Autónoma del Estado de México, km 1,5 Carretera Tenancingo Villa Guerrero, CP 52400; **Martha Lidya Salgado Siclán,** Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Edo. de México, CP 50200, México. Correspondencia: pablo_i_alvarez_r@yahoo.com

(Recibido: Junio 05, 2013 Aceptado: Septiembre 25, 2013)

Álvarez Romero PI, García Velasco R, Mora Herrera ME, González Díaz JG y Salgado Siclán ML. 2013. Estado actual de *Peronospora sparsa*, causante del Mildiu Velloso en Rosa (*Rosa* sp.). Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 113-125.

Resumen. La rosa (*Rosa* sp.) es una ornamental de importancia en México. Es afectada por un complejo de enfermedades, destacándose el Mildiu velloso ocasionado por el Chromista *Peronospora sparsa* que incide en la productividad, calidad, comercialización y costos de producción, las pérdidas llegan hasta el 100 % de los tallos florales. Entre los fungicidas empleados para el control del Mildiu velloso se destacan: fosetil-Al, dimetomorph, cymoxanil, metalaxyl. Al momento existen nuevas alternativas para el control de enfermedades como los fosfitos, que en investigaciones recientes, han demostrado el potencial que pueden brindar al controlar e inducir respuestas de defensa a patógenos como *P. sparsa* en cultivos de zarzamora y rosa. Actualmente se carece de un conocimiento profundo de aspectos de la epidemiología de *P. sparsa* y los procesos de infección, los cuales son necesarios para guiar los esfuerzos futuros para el desarrollo de alternativas de un manejo integrado de la enfermedad. En esta revisión se ha compilado y analizado la información de importancia que actualmente se dispone sobre el Mildiu velloso de la rosa.

Palabras clave adicionales: Oomycetes, Peronosporales, Rosaceae, ornamental.

La floricultura es una industria global en los países en vías de desarrollo y desarrollados; el volumen del comercio mundial se estima en un valor de más de 100 billones de dólares por año; los principales mercados consumidores son Alemania (22 %), los EE.UU. (15 %), Francia (10 %), el Reino Unido (10 %), Países Bajos (9 %), Japón (6 %), Suiza (5 %) e Italia (5 %) (African Business Magazine, 2012).

Abstract. Rose (*Rosa* sp.) is an important ornamental crop in Mexico. It is affected by a complex of plant diseases. Downy mildew caused by the Chromista *Peronospora sparsa* is one of the most important pathogens that influence the productivity, quality, marketing and production costs. Losses reach up to 100 % of the flowering stems. The main fungicides used to control downy mildew are: fosetil-Al, dimethomorph, cymoxanil and metalaxyl. However, new options for controlling plant diseases such as phosphites, are currently available. Recent trials have shown the potential of these compounds, to control diseases and to induce defense responses to pathogens such as *P. sparsa* in blackberry and rose crops. Currently, we do not have enough knowledge of aspects of the epidemiology of *P. sparsa* and infection processes, but they are needed to guide future efforts to develop integrated management alternatives of the disease. In this review we have examined and analyzed the main information currently available on downy mildew of rose crop.

Additional keywords: Oomycetes, Peronosporales, Rosaceae, ornamental.

Floriculture is a global industry in developing and developed countries; the volume of world trade is estimated to be worth over \$100 billion USD per year; main consumer markets are Germany (22 %), U.S. (15 %), France (10 %), UK (10 %), Netherlands (9 %), Japan (6 %), Switzerland (5 %) and Italy (5 %) (African Business Magazine, 2012).

The rose is one of the most popular flowers, it is regarded as the queen of flowers because of its aesthetic, beauty and high sentimental value; therefore, the flower industry uses it for both, floral arrangements and as pot plants (Bañon *et al*, 1993; Whitaker and Hokanson, 2009); this ornamental plant is of high economic importance in Mexico with 712.20 ha grown annually, the production is 5,559,218.51 gross (a gross refers to a group of 144 items, a dozen dozen), representing an economic contribution to the country of 1,225,457.39 thousand MXN (SIAP, 2012).

La rosa es una de las flores más apreciadas, se le considera como la reina de las flores por su estética, belleza y su alto valor sentimental; por lo que la industria florícola la utiliza tanto para arreglos florales, como en macetería (Bañon *et al.*, 1993; Whitaker y Hokanson, 2009); este cultivo ornamental es de importancia económica en México con 712,20 ha cultivadas anualmente, la producción es de 5.559.218,51 gruesas (una gruesa equivale doce docenas de tallos), representando un aporte económico para el país de 1.225.457,39 miles de pesos (SIAP, 2012).

El cultivo de rosa es influenciado por diferentes tipos de plagas y enfermedades, los cuales afectan la productividad y calidad, entre las enfermedades más importantes están las que atacan la parte aérea, como son: Mildiu vellosa causado por el Chromista *Peronospora sparsa*, la Cenicilla u Oídio pulverulento ocasionada por *Podosphaera pannosa*, la Mancha negra causada por *Diplocarpon rosae*, los agentes causantes de royas entre los que se reportan *Phragmidium rosae*; *Phragmidium mucronatum*, y el Moho gris ocasionado por *Botrytis cinerea* (Aergerter, 2002; Ritz *et al.*, 2005; Blechert y Debener, 2005; Horst y Cloyd, 2007; Lediuk *et al.*, 2010; Macnish *et al.*, 2010).

Los mildius vellosos han causado epidemias catastróficas en diferentes cultivos en el pasado, y algunos de ellos como en el caso de rosa aún siguen causando graves pérdidas; *P. sparsa*, incide en la productividad, calidad, comercialización y costos de producción, las pérdidas en rosa llegan hasta el 100 % de los tallos florales (Arbeláez, 1999; Agrios, 2005; Castillo *et al.*, 2010).

Son varias las hipótesis que plantean los investigadores y productores de rosas como las causas del resurgimiento del Mildiu vellosa en los países productores de rosa; entre otras se destacan la introducción y siembra de nuevas variedades de rosa susceptibles al patógeno, los cambios climáticos asociados con el calentamiento global, la modificación de los sistemas de producción de flores y el uso indiscriminado de fungicidas sistémicos para su control (Arbeláez, 1999; Ayala *et al.*, 2008).

Además de los enormes daños que *P. sparsa* ocasiona en cultivos de rosa, este patógeno también ha sido reportado afectando plantas de diferentes especies de *Rubus* spp. que producen frutos comestibles tales como *Rubus articus* y *Rubus chamaemorus* (Lindqvist-Kreuze *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2004) y recientemente se ha indicado que esta especie es el agente causante del Mildiu vellosa de la zarzamora (*Rubus fruticosos*) en México (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009), lo cual incrementa la importancia económica de este patógeno.

Actualmente se carece de un conocimiento detallado de la epidemiología de *P. sparsa* y de sus procesos de infección, pero dicha información es necesaria para guiar los esfuerzos futuros para el desarrollo de alternativas de un manejo integrado afines a una agricultura sustentable. El objetivo de esta revisión es compilar y analizar la información que actualmente se dispone sobre el Mildiu vellosa de la rosa.

Historia. La enfermedad fue reportada inicialmente en Inglaterra en 1862 por Berkeley, y al poco tiempo se

The rose crop is influenced by different types of pests and diseases that affect productivity and quality, among the most important diseases are those that attack the aerial parts, such as: downy mildew caused by Chromista *Peronospora sparsa*, the mildew or powdery mildew caused by *Podosphaera pannosa*, the Black spot caused by *Diplocarpon rosae*, the causative agents of rusts including *Phragmidium rosae*, *Phragmidium mucronatum*, and gray mold caused by *Botrytis cinerea* (Aergerter, 2002; Ritz *et al.*, 2005; Blechert y Debener, 2005; Horst y Cloyd, 2007; Lediuk *et al.*, 2010; Macnish *et al.*, 2010).

The downy mildews have caused catastrophic epidemics in different crops in the past, and some of them as in the case of roses still causes serious losses; *P. sparsa* impacts on productivity, quality, marketing and production costs, losses on rose crops can be up to 100 % of the flowering stems (Arbeláez, 1999; Agrios, 2005; Castillo *et al.*, 2010).

There are several hypotheses about the causes of the resurgence of downy mildew in roses producing countries; among others, it might be due to the introduction and planting of new rose varieties susceptible to the pathogen, the climatic changes associated with global warming, the changes in flowers production system and the indiscriminate use of systemic fungicides for their control (Arbeláez, 1999; Ayala *et al.*, 2008).

Besides the enormous damage that *P. sparsa* causes in rose crops, this pathogen has also been reported to affect plants of different *Rubus* spp. species that produce edible fruits such as *Rubus articus* and *Rubus chamaemorus* (Lindqvist-Kreuze *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2004) and it has been reported recently that this species is the causative agent of blackberry downy mildew (*Rubus fruticosos*) in Mexico (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009), which increases the economic importance of this pathogen.

There is currently no detailed knowledge of the *P. sparsa* epidemiology and infection processes, and such information is necessary to guide future efforts to develop an integrated treatment alternatives related to sustainable agriculture. The aim of this review is to compile and analyze the information currently available on the downy mildew of the rose.

History. The disease was first reported in England in 1862 by Berkeley, and soon reported in continental Europe, particularly in Scandinavia and the former Soviet Union. In 1880, the presence of the disease was reported in the Midwest of the United States; although scientific reports consider *P. sparsa* as a pathogen specific to the north area of the Tropic of Cancer, currently rose downy mildew cause significant damage in tropical and subtropical countries such as Brazil, Israel, Egypt, New Zealand and Colombia since the 70's (Berkeley, 1862; Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Walter *et al.*, 2004; Horst y Cloyd, 2007); in Mexico, the first report of *P. sparsa* affecting *R. fruticosos* was in Michoacan state (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009).

Taxonomic Classification. *Peronospora sparsa* is a biotrophic pathogen or obligate parasite which is part of the Oomycetes, which are mycelial organisms similar to fungi, commonly known as water molds and include

registró en Europa continental, específicamente en los países escandinavos y la antigua Unión Soviética. En 1880 la presencia de esta enfermedad se reportó en el medio oeste de los Estados Unidos; aunque los reportes científicos registran a *P. sparsa* como un patógeno propio del área norte del trópico de Cáncer, en la actualidad el Mildiu vellosa de la rosa causa daños significativos en países tropicales y subtropicales como Brasil, Israel, Egipto, Nueva Zelanda y Colombia desde la década de los 70 (Berkeley, 1862; Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Walter *et al.*, 2004; Horst y Cloyd, 2007); en México el primer reporte de *P. sparsa* afectando a *R. fruticosos* fue en el estado de Michoacán (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009).

Clasificación Taxonómica. *Peronospora sparsa* es un patógeno biotrofo o parásito obligado que forma parte de los Oomycetes, los cuales son organismos miceliares semejantes a los hongos, que se conocen comúnmente como mohos acuáticos e incluyen saprófitos y patógenos de plantas, insectos, crustáceos, peces, animales vertebrados y de otros microorganismos (Kamoun, 2003); se le considera miembro del reino Chromista, subreino Heterokonta (Hawksworth *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 2005), aunque algunos autores lo ubican en el reino Straminopila (Dick, 2001; Kamoun, 2003), este patógeno pertenece al orden Peronosporales, familia Peronosporaceae; género *Peronospora*; especie *P. sparsa* Berkeley (Robert *et al.*, 2005; NCBI, 2013).

Relaciones Filogenéticas. Uno de los aspectos más estudiados en los Oomycetes en los últimos años ha sido sus relaciones filogenéticas intra e intergenéricas; para el caso de *P. sparsa*, los análisis de secuencias basados en la región ITS del ADNr, han ubicado a esta especie en un grupo filogenético que incluye además a *Phytophthora megakarya*, *Phytophthora palmivora* y *Phytophthora arecae*, especies tropicales que presentan caracteres evolutivos avanzados tales como esporangios caducopapilados y adaptación a hábitats aéreos; la formación de este clúster entre especies de *Phytophthora* y *Peronospora*, confirma la hipótesis de que los mildius vellosos posiblemente evolucionaron a partir de ancestros hemibiotrofos (Cooke *et al.*, 2000). Por otra parte, Riethmuller *et al.* (2002), luego de realizar un análisis filogenético de la familia Peronosporaceae con base en las secuencias de la región 28S del ADNr, determinaron que *P. sparsa* se encontraba relacionado con la especie *Peronospora sanguisorbae* en un clúster aislado del grupo que incluyó a la mayor parte de las especies del género *Peronospora*; y Goker *et al.* (2009), desarrollaron un método de taxonomía molecular que permitió determinar la función de la distancia y configuración de clúster que se tradujeron en una concordancia óptima con los datos de referencia seleccionados; la optimización se basó tanto en información de referencia basada en taxonomía, como en información basada en el hospedante, agrupando a *P. sparsa* en un clúster relacionado con *P. alchemillae*; estos estudios conducen a suponer que todavía se requieren de más estudios tendientes para aclarar la posición taxonómica del agente causante del Mildiu vellosa de la rosa .

Diversidad Genética de *Peronospora sparsa*. Para

saprophytes, plant pathogens, insects pathogens, crustaceans pathogens, fish pathogens, vertebrates pathogens and other microorganisms (Kamoun, 2003); it is considered a member of the Chromista kingdom and Heterokonta subkingdom (Hawksworth *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 2005), although some authors consider it part of the Straminopila kingdom (Dick, 2001; Kamoun, 2003), this pathogen is part of the Peronosporales order, Peronosporaceae family, *Peronospora* genus, *P. sparsa* Berkeley species (Robert *et al.*, 2005; NCBI, 2013).

Phylogenetic Relationships. In recent years, one of the most studied aspects of the Oomycetes is their intra- and intergeneric phylogenetic relationships; in the case of *P. sparsa*, sequence analyzes based on the ITS region of the rDNA, have located this species in a phylogenetic group that also includes *Phytophthora megakarya*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora arecae*, which are tropical species exhibiting advanced evolutionary characters such as caducous sporangia and adaptation to aerial habitats; the formation of this cluster between *Phytophthora* and *Peronospora* species, confirms the hypothesis that the downy mildews possibly evolved from hemibiotrophs ancestors (Cooke *et al.*, 2000). On the other hand, Riethmuller *et al.* (2002), after conducting a phylogenetic analysis of the Peronosporaceae family based on the sequences of the 28S rDNA region, determined that *P. sparsa* was related to *Peronospora sanguisorbae* species on an isolated cluster group that included most of the *Peronospora* genus; and Goker *et al.* (2009) developed a method of molecular taxonomy that allowed to determine the function of the distance and cluster configuration that resulted in a good agreement with the reference data selected; optimization was based on both reference information based on taxonomy and host -based information, grouping *P. sparsa* on a cluster related to *P. alchemillae*; these studies suggest that still further research is necessary to clarify the taxonomic position of the causal agent of the rose downy mildew.

Genetic Diversity of *Peronospora sparsa*. To further understand the *P. sparsa* population structure affecting *R. articus* in Finland, Linqvist-Kreuze *et al.* (2002) carried out studies on the genetic variability; in their study 226 AFLP markers were used and it was determined that this pathogen has a high genetic variability represented in Jaccard distances ranging between 0.53 and 0.88, this is due to the biology of Scandinavian *P. sparsa* which is characterized by oospores mass production that result in genetic recombination of the pathogen gametangium and also serve as resistance structures to the pathogen during the long winter periods of this part of the world.

This situation contrasts sharply with a population study carried out in Colombia, where 34 isolates of the pseudofungi were collected in crops of roses located in Antioquia and Bogota savanna; their DNA was extracted to carry out PCR amplification of the ITS region of the rDNA using the specific primers PS3 (5' ATT TTG TGC TGG CTG GC 3') and PS1 (5' TGC CAC ACG ACC GAA GC 3'); such products were used for both, the direct sequencing and for evaluating the genetic variability by PCR RFLP technique,

profundizar el conocimiento de la estructura poblacional de *P. sparsa* afectando a *R. articus* en Finlandia se desarrolló una investigación por Linqvist-Kreuzer *et al.* (2002) sobre la variabilidad genética, en ese estudio se emplearon 226 marcadores AFLPs y se determinó que este patógeno presenta una alta variabilidad genética representada en distancias de Jaccard que oscilaron entre 0,53 y 0,88, esto debido a que la biología de *P. sparsa* en esta región escandinava se caracteriza por la producción masiva de esporas, que resultan de la recombinación genética de los gametangios del patógeno y sirven además de estructuras de resistencia al patógeno durante los largos periodos invernales que soporta esta zona del mundo.

Esta situación contrasta drásticamente con un trabajo poblacional que se hizo en Colombia, en donde se colectaron 34 aislamientos del pseudohongo en cultivos de rosas ubicados en Antioquia y la sabana de Bogotá, se extrajo su ADN para proceder a la amplificación mediante PCR de la región ITS del ADNr utilizando los primers específicos PS3 (5' ATT TTG TGC TGG CTG GC 3') y PS1 (5' TGC CAC ACG ACC GAA GC 3'); dichos productos se emplearon tanto para su secuenciación directa como para la evaluación de variabilidad genética mediante la técnica PCR RFLP, estos resultados se complementaron con la utilización de los marcadores RAPD y RAMS. La presencia de un amplicón de aproximadamente 700 pb que compartió un porcentaje de identidad del 100 % con secuencias depositadas en el GenBank, permitió confirmar a los aislamientos como pertenecientes a *Peronospora sparsa*, mientras que el análisis de RFLP, RAPD y RAMS indicó un muy bajo nivel de variabilidad entre todos los aislamientos, concluyéndose que la población de *P. sparsa* en Colombia es predominantemente clonal (Ayala *et al.*, 2008).

Morfología. *P. sparsa* en el cultivo de rosa se caracteriza por poseer micelio intercelular en el tejido del hospedante; tiene esporangios que son coloreados, lisos, no papilados y de formas subelípticas, con rangos de dimensiones que van de 14-18 μm x 17-22 μm , producidos en los ápices de los esporangióforos erectos y dicotómicamente ramificados en ángulos agudos (Wheeler, 1981; Thines *et al.*, 2006; Horst y Cloyd, 2007); aunque en estudios realizados en rosa por Achar (1997) los esporangios alcanzaron medidas en rangos de 14-18 μm x 20-23 μm ; los esporangióforos alcanzan rangos de 150-350 μm en rosa (Wheeler, 1981; Achar, 1997; Horst y Cloyd, 2007).

P. sparsa en *R. fruticosos* en México, desarrolla esporangios coloreados de color café claro, de forma ovoide a elíptica con rangos que van de 14-22 μm x 11-18 μm (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009); por otra parte, Hall y Gardner (1982), reportan que las oosporas de *P. sparsa* en *Rubus* spp. son simples de forma esférica a oval, de 18-28 μm de diámetro, contenidas en oogonios de pared delgada, de 26-35 μm de diámetro; la pared celular de las oosporas de *P. sparsa* y otros mildiús vellosos tiene tres capas, pared exterior o exosporium, que es de color café dorado claro cuando están maduras, variables en grosor, de 1,5-4 μm , y superficialmente lisa o irregular, pared intermedia o mesosporium, menor a 1 μm de grosor; y la pared interior, o endosporium es de grosor uniforme de 2-3 μm y de color

the results were complemented with the use of RAPD and RAMS markers. The presence of an approximately 700 bp amplicon which shared 100 % identity with sequences deposited in GenBank, confirmed that isolates belonged to *Peronospora sparsa*, while RFLP, RAPD and RAMS analysis indicated a very low level of variability among all isolates, concluding that *P. sparsa* population in Colombia is mainly clonal (Ayala *et al.*, 2008).

Morphology. *P. sparsa* in rose crops is characterized by having an intercellular mycelia in the host tissue; it has colored sporangia, smooth, not papillate and with subelliptic forms ranging from 14-18 μm x 17-22 μm , produced in the apices of the erect sporangiophores and dichotomically branched in acute angles (Wheeler, 1981; Thines *et al.*, 2006; Horst y Cloyd, 2007); although in roses studies carried out by Achar (1997), the sporangia reached ranges of 14-18 μm x 20-23 μm and sporangiophores reach ranges of 150-350 μm in rose (Wheeler, 1981; Achar, 1997; Horst and Cloyd, 2007).

In Mexico, *P. sparsa* in *R. fruticosos* develops light brown sporangia, ovoid to elliptical shape with ranges of 14-22 μm x 11-18 μm (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009.) On the other hand, Hall and Gardner (1982) reported that oospores of *P. sparsa* in *Rubus* spp. are simple of oval to spherical shape, 18-28 μm in diameter, contained in thin-walled oogonia, 26-35 μm in diameter; the cell wall of oospores of *P. sparsa* and other downy mildews has three layers: outer wall or exosporium, which is light golden brown when ripe, variable in thickness, 1.5-4 μm , and superficially smooth or irregular; intermediate wall or mesosporium, less than 1 μm in thickness; and the inner wall, or endosporium which is uniform in thickness, 2-3 μm and hyaline color (Hall and Gardner, 1982).

Symptoms and Signs. Although the infection is usually restricted to young plant tissue, the symptoms of this disease occur on leaves, stems, stalks, calyx and petals of rose plants; on the upper side of leaves some purple reddish-dark brown blotches develop, which are surrounded by a chlorotic halo, while on the underside of the leaves, the signs of the pathogen are produced and they usually are a light brown mycelium occur with abundant production of sporangiophores and sporangia, which creates the appearance of hairiness characteristic of the disease (Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007). These structures only occur under conditions of high humidity, becoming scarce and difficult to detect in unfavorable situations for pathogen development (Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007). The disease can also induce severe defoliation on susceptible rose varieties and is common that foliar symptoms are mistaken with burns or toxicity caused by pesticides. On the stems, calyx and stems, the disease manifests as a black purple spots that vary in size and may even coalesce inducing death of branches and mummification of flower buds (Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007) or promoting secondary invasion of the tissues affected by other pathogens such *Botrytis* spp. (Aegerter *et al.*, 2002).

Molecular tools. Molecular tools have been used in

hialino (Hall y Gardner, 1982).

Síntomas y Signos. Aunque generalmente la infección es restringida a los tejidos jóvenes de las plantas, los síntomas de esta enfermedad se presentan sobre hojas, tallos, pedúnculos, cáliz y pétalos de las plantas de rosa; en la haz de las hojas se desarrollan manchas irregulares de color rojizo púrpura a pardo-oscuro, las cuales se rodean de un halo clorótico, mientras que por el envés se producen los signos del patógeno, que corresponden a un micelio de color marrón claro con abundante producción de esporangióforos y esporangios, lo cual genera la apariencia de vellosidad característica de la enfermedad (Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007). Estas estructuras solo se producen bajo condiciones de alta humedad, llegando a ser escasas y difíciles de detectar en situaciones desfavorables para el desarrollo del patógeno (Wheeler, 1981; Arbeláez, 1999; Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007). La enfermedad puede inducir además una defoliación severa sobre las variedades de rosa más susceptibles y es común que los síntomas foliares se confundan con quemaduras o toxicidad ocasionada por pesticidas. Sobre los tallos, cáliz y pedúnculos, la enfermedad se manifiesta como manchas púrpuras a negras que varían en tamaño e incluso pueden coalescer induciendo a la muerte de las ramas y a la momificación de los botones florales (Hollier *et al.*, 2001; Horst y Cloyd, 2007) o propiciando la invasión secundaria de los tejidos afectados por parte de otros patógenos, tales como *Botrytis* spp. (Aegerter *et al.*, 2002).

Herramientas moleculares. El empleo de las herramientas moleculares se ha empleado en estudios taxonómicos, y además estas técnicas también se han usado para aplicaciones prácticas como por ejemplo en la detección prematura de *P. sparsa* a partir de materiales de propagación y cultivos en desarrollo de *Rosa* spp. y zarzamora (*Rubus fruticosos*) (Aegerter *et al.*, 2002; Ayala *et al.*, 2008; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012); con este objetivo, Aegerter *et al.* (2002) diseñaron un par de primers específicos PS3 (5' ATT TTG TGC TGG CTG GC 3') y PSI (5' TGC CAC ACG ACC GAA GC 3'), con base en la región ITS del ADNr, los cuales resultan altamente efectivos para la detección de cantidades tan bajas como 2 pg de ADN del patógeno, además de ser útiles para la amplificación de ADN obtenido a partir de plantas de rosa asintomáticas pero infectadas por el pseudohongo.

Mecanismos de infección. *P. sparsa* necesita tejido vivo para sobrevivir y es altamente especializado en las plantas hospedantes que afecta. El pseudohongo penetra al hospedante en forma directa a través de la cutícula y la epidermis, y se alimenta de las células del parénquima por medio de haustorios y una profusa red de micelio intercelular (Michelmore *et al.*, 1988), los esporangios germinan directamente sobre el hospedante y los estados iniciales de la infección se dan de la misma manera en que se presenten condiciones ambientales favorables para su desarrollo y a las características de resistencia o susceptibilidad de la variedad del hospedante; la habilidad de *P. sparsa* de formar infecciones sistémicas en plantas leñosas como rosa, ha sido documentada en trabajos

taxonómicos y en aplicaciones prácticas como en la detección temprana de *P. sparsa* en materiales de propagación y cultivos en desarrollo de *Rosa* spp. y zarzamora (*Rubus fruticosos*) (Aegerter *et al.*, 2002; Ayala *et al.*, 2008; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). Con este propósito, Aegerter *et al.* (2002) diseñaron un par de primers, PS3 (5' ATT TTG TGC TGG CTG GC 3') y PSI (5' TGC CAC ACG ACC GAA GC 3'), basados en la región ITS del rDNA, los cuales son altamente efectivos para la detección de cantidades tan bajas como 2 pg de ADN del patógeno, así como también ser útiles para la amplificación de ADN obtenida de plantas de rosa asintomáticas pero infectadas por el pseudohongo.

Infección mechanisms. *P. sparsa* necesita tejido vivo para sobrevivir y es altamente especializado en las plantas hospedantes que afecta. El pseudohongo penetra al hospedante directamente a través de la cutícula y la epidermis, y se alimenta de las células del parénquima por medio de haustorios y una profusa red de micelio intercelular (Michelmore *et al.*, 1988), los esporangios germinan directamente sobre el hospedante y los estados iniciales de la infección ocurren solo si las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo y si las características de resistencia o susceptibilidad de la variedad del hospedante son adecuadas; *P. sparsa*'s capacidad de formar infecciones sistémicas en plantas leñosas como rosas, ha sido documentada en Aegerter *et al.* (2002); esto es extremadamente importante, especialmente para cultivos propagados vegetativamente como *Rosa* spp. y *Rubus* spp., aunque la dispersión en los tejidos vasculares de *Rubus* spp. ha sido limitada a unos pocos centímetros por debajo de los nodos infectados (Williamson *et al.*, 1995). Estudios epidemiológicos han encontrado que las condiciones favorables para el desarrollo de *P. sparsa* en rosas corresponden a temperaturas entre 15 y 20 °C durante el proceso de infección y 20 a 25 °C para la colonización; la infección es influenciada por la presencia de una capa delgada de agua en la superficie del tejido por al menos dos horas; sin embargo, el proceso infeccioso aumenta significativamente cuando tales condiciones de humedad permanecen por más de 10 h (Aegerter *et al.*, 2003). El período latente del patógeno ha sido estimado de 4-7 días, observándose también que *P. sparsa* es capaz de iniciar su ciclo de infección a temperaturas tan bajas como 5 °C tan pronto como una capa delgada de agua permanece en el tejido por más de 8 hrs (Aegerter *et al.*, 2003); los esporangios germinan formando un tubo germinal que desarrolla un apressorio; el micelio crece por una vía intercelular y se alimenta de las células del parénquima a través del haustorio intracelular (Clark y Spencer, 2004). Como la infección progresa, los cambios en los patrones de translocación, los niveles hormonales y la permeabilidad de la célula hospedante tipifican una interacción biotrófica; el suero y otros nutrientes se mueven desde las hojas hacia las zonas de infección originadas por lesiones localizadas. Otros cambios incluyen un aumento en la actividad de ciertas enzimas de la planta, incluyendo invertasa, α -glucosidasas, ribonucleasa, β -1,3-glucanasas y algunas quitinasas isoenzimas (Clark y Spencer, 2004).

Reproduction. *P. sparsa* se reproduce sexualmente a través de machos y hembras gametangios conocidos como anteridias y oogonias con la posterior formación de oosporas, las cuales se forman por paredes gruesas que las hacen muy resistentes a las condiciones ambientales adversas (Arbeláez, 1999); además, el ciclo sexual también mejora la capacidad del patógeno de proporcionar un mecanismo para su variación genética.

descritos por Aegerter *et al.* (2002); esto es de suma importancia, en especial para cultivos propagados vegetativamente como *Rosa* sp. y *Rubus* spp., aunque la dispersión en los tejidos vasculares de *Rubus* spp. ha sido limitada a pocos centímetros por debajo de los nudos infectados (Williamson *et al.*, 1995). Estudios epidemiológicos han determinado que las condiciones favorables para el desarrollo de *P. sparsa* en rosa bajo invernadero corresponden a temperaturas que oscilan entre 15 y 20 °C durante el proceso de infección y de 20 a 25 °C para la colonización del patógeno; la infección está influenciada por la presencia de una lámina de agua libre sobre la superficie del tejido por un período mínimo de dos horas; sin embargo, el proceso infectivo se incrementa significativamente cuando dichas condiciones de humedad superan las 10 h (Aegerter *et al.*, 2003). El período de latencia del patógeno se ha estimado entre cuatro y siete días, determinándose además que *P. sparsa* es capaz de iniciar su ciclo de infección a temperaturas tan bajas como 5 °C, siempre y cuando exista una lámina de agua sobre el tejido durante al menos ocho horas (Aegerter *et al.*, 2003); los esporangios germinan formando un tubo germinativo el cual desarrolla un apresorio; el micelio crece de manera intercelular y se alimenta de células del parénquima a través del haustorio (Clark y Spencer, 2004). A medida que la infección progresa, los cambios en los patrones de translocación, los niveles hormonales y la permeabilidad de la célula del hospedante tipifican una interacción biotrófica; sacarosa y otros nutrientes se mueven de las hojas a nuevas zonas de infección originadas por lesiones localizadas. Otros cambios adicionales incluyen incremento en la actividad por parte de la planta de algunas enzimas, incluyendo invertasas, α -glucosidasas, ribonucleasas, β -1,3-glucanasas y algunas isoenzimas de quitinasas (Clark y Spencer, 2004).

Reproducción. *P. sparsa* realiza la reproducción sexual a través de gametangios masculinos y femeninos llamados anteridios y oogonios con la posterior formación de oosporas, las cuales son provistas de paredes gruesas, que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables (Arbeláez, 1999), además el ciclo sexual también mejora la aptitud de este patógeno al proporcionar un mecanismo para su variación genética (Judelson, 2009). La formación de oosporas es característica de las zonas templadas y rara vez ocurren en los trópicos (Arbeláez, 1999); en las zonas templadas la producción de oosporas es profusa en el mesófilo de las hojas, así como también en la corteza de los tallos, raíces y pedúnculos de las plantas sintomáticas de rosa (Aegerter *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2004). La reproducción asexual de *P. sparsa*, se da por medio de esporangiogénesis, que es la formación de esporangios multinucleados en los extremos de esporangióforos ramificados dicotómicamente, estos se comportan como conidios porque germinan directamente a través de un tubo germinativo (Agrios, 2005; Horst y Cloyd, 2007; Hardham, 2009).

Dispersión y sobrevivencia. Los esporangios producidos sobre esporangióforos, cuando están maduros son diseminados por el viento al follaje y flores en

(Judelson, 2009). Oospores formation is characteristic of temperate zones and rarely occur in the tropics (Arbeláez, 1999); in temperate areas, oospores production is profuse in the mesophyll of leaves, as well as in the bark of stems, roots and peduncles of the rose symptomatic plants (Aegerter *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2004). Asexual reproduction of *P. sparsa*, occurs through sporangium-genesis, which is the formation of sporangia multinucleated on the ends of dichotomously branched sporangiophores, these behave as conidia because they germinate directly through a germ-tube (Agrios, 2005; Horst and Cloyd, 2007; Hardham, 2009).

Dispersion and survival. When sporangia produced on sporangiophores are mature, they spread by the wind to developing foliage and flowers. Symptoms usually develop within 11 days after infection, with sporulation occurring 5-11 days later (Walter *et al.*, 2004), *P. sparsa* can survive the winter as mycelium without formation of oospores in roots, crowns, stems and buds (Walter *et al.*, 2004; Horst and Cloyd, 2007), although oospores are the main source of inoculum during winter besides being a survival structure (Horst and Cloyd, 2007).

Using the microscope, Tate (1981) proved that in the systemic infection of *Rubus loganobaccus* cortex by *P. sparsa*, the pathogen survived the winter on the crown tissues and grew along with the emergence of the woody part and buds till the next season; the same investigation suggested that the practice of spreading patterns of these plants ensures the transmission of the disease to new plants and production areas. In *R. articus* cultivated in Finland, downy mildew caused by *P. sparsa* was observed in growing new tissues of roots collected in commercial fields (Lindqvist-Kreuzer *et al.*, 1998). In roses is possible that the pathogen transmission to growing new tissues of crowns or woody parts of infected plants can also occur (Aegerter *et al.*, 2002).

Disease Treatment. Treatment of rose downy mildew has been difficult due to the high susceptibility of most commercial rose varieties grown in the world; there are no reports of materials resistant to *P. sparsa*, for example, in Colombia the pathogen is highly aggressive on Charlotte, Classy, First red, Dolores, Frisco, Konfetti, Livia, Mystique, Osiana, Pavarotti and Ravel varieties (Flórez, 1996; Restrepo, 1996; Gomez and Arbelaez, 2005); besides, the patterns influence with some degree of susceptibility, which was confirmed by Aegerter *et al.* (2002), who reported Manetti as highly susceptible to downy mildew. At commercial level in Bogota savanna, some producers have found that the Natal Briar rootstock increases the susceptibility of rose varieties to downy mildew (Gómez y Arbeláez, 2005).

Control of downy mildew also requires an appropriate cultural treatment; practices such as the removal and destruction of infected material such as stems, leaves and symptomatic flowers, are necessary to reduce the level of inoculum in the crop; it has also been suggested that the treatment of greenhouse environmental conditions is the most appropriate way to handle this type of epidemics by opening and closing ducts and curtains and implementing

desarrollo. Los síntomas generalmente se desarrollan dentro de los 11 días después de la infección, con la esporulación que ocurre 5-11 días más tarde (Walter *et al.*, 2004), *P. sparsa* puede sobrevivir durante el invierno en forma de micelio sin la formación de oosporas en raíces, coronas, brotes y tallos (Walter *et al.*, 2004; Horst y Cloyd, 2007), aunque las oosporas son la principal fuente de inóculo durante el invierno además de ser una estructura de supervivencia (Horst y Cloyd, 2007).

Usando el microscopio, Tate (1981) demostró que en la infección sistémica del córtex de *Rubus loganobaccus* por *P. sparsa*, el patógeno parece pasar el invierno en los tejidos de la corona y crece junto con la emergencia de la parte leñosa y de los brotes en la siguiente estación; el mismo investigador sugiere que la práctica de propagar patrones de estas plantas garantiza la trasmisión de la enfermedad hacia nuevas plantas y áreas de producción. En *R. articus* cultivado en Finlandia, el Mildiu vellosa causado por *P. sparsa* fue observado en nuevos tejidos en crecimiento de raíces colectadas de campos comerciales (Lindqvist-Kreuzer *et al.*, 1998). En rosas es posible que la trasmisión del patógeno a nuevos tejidos en crecimiento de coronas o parte leñosa de plantas infectadas también puede ocurrir (Aegerter *et al.*, 2002).

Manejo de la Enfermedad. El manejo del Mildiu vellosa de la rosa ha sido difícil debido a la alta susceptibilidad de la mayoría de las variedades comerciales de rosa cultivadas en el mundo; no se han documentado materiales resistentes a *P. sparsa*, en Colombia por ejemplo, el patógeno es altamente agresivo sobre las variedades Charlotte, Classy, First red, Dolores, Frisco, Konfetti, Livia, Mystique, Osiana, Pavarotti y Ravel (Flórez, 1996; Restrepo, 1996; Gómez y Arbeláez, 2005); además, los patrones influyen con algún grado de susceptibilidad, lo cual lo confirma Aegerter *et al.* (2002), que reportaron a Manetti como altamente susceptible al Mildiu vellosa. A nivel comercial en la Sabana de Bogotá, algunos productores han observado que el portainjerto Natal Briar aumenta la susceptibilidad de las variedades de rosa al Mildiu vellosa (Gómez y Arbeláez, 2005).

El control del Mildiu vellosa también requiere de un adecuado manejo cultural; prácticas como la remoción y destrucción de material infectado como tallos, hojas y flores sintomáticas, son necesarias para reducir el nivel de inóculo en los cultivos; adicionalmente se ha planteado que el manejo de las condiciones ambientales de los invernaderos es la forma más adecuada para el manejo de este tipo de epidemias mediante la apertura y cierre de ductos y cortinas y la ejecución de prácticas adecuadas de riego, son fundamentales para disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad (Quitian, 1995; Restrepo, 1996; Quiroga y Arbeláez, 2004).

Actualmente el manejo de *P. sparsa* está basado principalmente en la aplicación de fungicidas (Quiroga y Arbeláez, 2004), el metalaxyl o mfenoxam es uno de los fungicidas más utilizados para el manejo de enfermedades causadas por Oomycetes (Gisi, 2002); el metalaxyl es un fungicida sistémico que contiene R y S-enantiómeros, mientras que el mfenoxam o metalaxyl-M contiene 98 % de

appropriate irrigation practices are essential to decrease incidence and severity of disease (Quitian, 1995; Restrepo, 1996; Quiroga and Arbeláez, 2004).

Currently *P. sparsa* treatment is mainly based on the application of fungicides (Quiroga and Arbeláez, 2004), metalaxyl or mfenoxam is one of the most commonly used fungicides for treatment of diseases caused by Oomycetes (Gisi, 2002); Metalaxyl is a systemic fungicide containing R and S-enantiomers, while the mfenoxam or metalaxyl-M contain only 98 % of R enantiomers (Nuninger, *et al.*, 1996); this product has been used for preventive, curative, in seed treatment, treatment of the roots and foliar applications (Copping and Hewitt, 1998); it is systemic with a fast acropetal absorption, and with limited activity via symplast (Lyr, 1995; Copping and Hewitt, 1998); it interferes with the synthesis of nucleic acids by inhibiting ribosomal RNA and it has shown good control on rose *P. sparsa* by immersion of Manetti patterns, significantly reducing the disease (Aegerter *et al.*, 2002). Studies carried out in New Zealand with *Rubus hybrid*, showed that the disease can be successfully controlled with the use of metalaxyl and mancozeb (Tate *et al.*, 1981); under low disease pressure two applications of metalaxyl-M, three of phosphorous acid, and three more of azoxystrobin with dichlofluanid applied 21 d before flowering, significantly reduced the losses caused by downy mildew in *R. hybrid* (Walter *et al.*, 2004); however, in other studies in rose producing countries, such as Colombia (Quiroga and Arbeláez, 2004), metalaxyl did not provide an effective control of downy mildew when applied to soil or to the foliage; the possible inefficiency of this fungicide could be the resistance developed by the pathogen or the excessive use of this product, as was the case with this fungicide in other crops in the world and with other Oomycetes (Viranyi, 1988).

Some recommendations of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) to avoid problems of ineffectiveness such as those reported in cucurbit mildews are: not using metalaxyl in soil applications; in order to control foliar diseases, limit to 2-4 consecutive applications per crop/year and use it only as preventative, not curative or eradicator applications (Brent and Hollomon, 2007). With high pressure of the disease, metalaxyl had no significant effect in the control of *P. sparsa* on *R. hybrid*, only phosphorous acid with three applications showed an acceptable control of this pathogen (Walter *et al.*, 2004). This is an innovative strategy within integrated crop management because the use of biocompatible chemical compounds such as phosphonates (including phosphorous acid or phosphites) promote disease resistance in plants through induced resistance (Daayf *et al.*, 2000; Shibuya y Minami, 2001; Altamiranda *et al.*, 2008). Phosphites, inorganic salts derived from phosphorous acid have particular attention as they are systemic via symplast and apoplast, and they are able to control crop diseases caused by Oomycetes such as *P. sparsa* (McDonald *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Deliopoulos *et al.*, 2010; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012) through direct effects on pathogens and indirect effects by stimulating host defense responses. Furthermore, phosphites do not require

R enantiómeros (Nuninger *et al.*, 1996), este producto ha sido utilizado tanto en forma preventiva, como curativa, en el tratamiento de semillas, tratamiento de las raíces y para aplicaciones foliares (Copping y Hewitt, 1998); es sistémico con absorción rápida acropétala, y con actividad limitada vía simplasto (Lyr 1995; Copping y Hewitt, 1998); actúa interfiriendo con la síntesis de ácidos nucleicos mediante la inhibición de ARN ribosómico y ha mostrado buen control sobre *P. sparsa* en rosa en inmersiones del patrón Manetti, reduciendo notablemente la enfermedad (Aegerter *et al.*, 2002). Estudios realizados en Nueva Zelanda en *Rubus hybrid* demostraron que la enfermedad puede ser controlada exitosamente con el uso de metalaxyl y mancozeb (Tate *et al.*, 1981); bajo una presión baja de la enfermedad dos aplicaciones de metalaxyl-M, tres de ácido fosforoso y tres de azoxystrobin más diclofluanid aplicados 21 días antes de la floración redujeron significativamente las pérdidas causadas por el Mildiu vellosa en *R. hybrid* (Walter *et al.*, 2004); sin embargo, en otros estudios en países productores de rosa, como los realizadas por Quiroga y Arbeláez (2004) en Colombia, el metalaxyl no presentó un control eficaz del Mildiu vellosa, ni aplicado al suelo ni al follaje; la posible ineficiencia de este fungicida pudo ser por la resistencia que está desarrollando el patógeno, al uso desmedido de este producto, así como ha ocurrido con este fungicida en otros cultivos en el mundo y con otros Oomycetes (Viranyi, 1988).

Algunas recomendaciones del Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas (FRAC) para evitar problemas de no efectividad como los reportados en mildiús de cucurbitáceas son: no usar el metalaxyl en aplicaciones al suelo, para controlar enfermedades foliares, limitarse de dos a cuatro aplicaciones seguidas por cultivo, por año y usarlo solamente como preventivo, no como curativo, ni en aplicaciones erradicantes (Brent y Hollomon, 2007). Con altas presiones de la enfermedad el metalaxyl no tuvo efecto considerable para el control de *P. sparsa* en *R. hybrid*, únicamente el ácido fosforoso con tres aplicaciones mostró un control aceptable sobre este patógeno (Walter *et al.*, 2004); esta es una estrategia innovadora, dentro del manejo integrado de cultivos, ya que el uso de compuestos químicos biocompatibles como los fosfonatos (incluyen el ácido fosforoso o fosfitos) promueven la resistencia a enfermedades en plantas a través de resistencia inducida (Daayf *et al.*, 2000; Shibuya y Minami, 2001; Altamiranda *et al.*, 2008). Los fosfitos, sales inorgánicas derivadas del ácido fosforoso tienen particular atención, son sistémicos vía simplasto y apoplasto, son capaces de controlar enfermedades en cultivos causadas por Oomycetes como *P. sparsa* (McDonald *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Deliopoulos *et al.*, 2010; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012) a través de efectos directos sobre los patógenos y efectos indirectos mediante la estimulación de respuestas de defensa del hospedante. Además los fosfitos no requieren intervalos de seguridad (Deliopoulos *et al.*, 2010; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). Los efectos directos incluyen la inhibición del crecimiento micelial y la reducción o alteración del metabolismo del patógeno (Grant *et al.*, 1990; Guest y Grant, 1991; Wilkinson *et al.*, 2001; King *et al.*,

confidence intervals (Deliopoulos *et al.*, 2010; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). Direct effects include inhibition of mycelial growth and reduction or alteration of pathogen metabolism (Grant *et al.*, 1990; Guest y Grant, 1991; Wilkinson *et al.*, 2001; King *et al.*, 2010), while the indirect effect involves stimulation of defense mechanisms of plants such as production of phytoalexins and reactive oxygen species (ROS), induction of pathogenicity related (PRs) proteins, strengthening of the cell wall by lignification and callose deposition, and the activation of the systemic acquired resistance (SAR) pathway associated to salicylic acid (Guest y Grant, 1991; Lobato *et al.*, 2008, 2011; Pilbeam *et al.*, 2011; Eshraghi *et al.*, 2011; Machinandiarena *et al.*, 2012). Finnish studies showed that potassium phosphite used in greenhouses for controlling *P. sparsa* in *Rubus arcticus* only had moderate control when compared to other fungicides with different action mechanism (Hukkanen *et al.*, 2008). Another product within the phosphonates group is fosetil-Al, Gisi (2002) reported that this product controlled most Oomycetes; *P. sparsa* in *Rubus fruticosus* and *Rosa* spp. has been controlled with fosetil-Al (O'Neil *et al.*, 2002). Quiroga and Arbeláez (2004) studies in roses showed that the fungicide based on fosetil-Al had the lowest incidence value and severity of *P. sparsa*, applications with this product were every four days for five weeks, with a total of nine applications, the product was superior to other fungicides because is a substance of higher systemicity, which makes its mobility protect other areas of the plant and also, because of its conversion to phosphonic acid this substance reduces the disease, besides its own fungitoxic activity (Cooke and Little, 2001); however, there can be phytotoxicity problems with continuous applications, manifesting symptoms like brown spots on stems, chlorotic leaves and smaller leaves than those untreated (Quiroga and Arbeláez, 2004).

Another fungicide for *P. sparsa* control is dimethomorph, which is a compound derived from cinnamic acid. In experiments with roses, the treatments with this compound showed low incidence values making it an alternative for rotation with other fungicides. The mode of action of dimethomorph is translaminar and its mechanism of action is the inhibition of cell wall formation, causing lysis and cell death, it also shows excellent antispore activity, preventing the formation of oospores and sporangia (Cohen *et al.*, 1995; Fernández-Northcote *et al.* 2000).

The use of biological control for this pathogen is a rarely used, tested and reported alternative with only few scientific reports. Rebollar-Alviter *et al.* (2012) used *Bacillus subtilis* as a rotation in a management program of *P. sparsa* in *R. fruticosus*; however, it is necessary that these studies are carried out and replicated elsewhere, in order to make sure that biological control is a viable alternative.

Environmental conditions are important in the processes of downy mildew infection and the construction of downy mildew forecasting model that use weather patterns from data provided by weather stations would provide high flexibility for implementing a warning system in areas where data are not available. Kwang *et al.*

2010), mientras que el efecto indirecto involucra la estimulación de mecanismos de defensa de las plantas como la producción de fitoalexinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), la inducción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs), el reforzamiento de la pared celular mediante la lignificación y deposición de calosa, y la activación de la vía de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), asociada al ácido salicílico (Guest y Grant, 1991; Lobato *et al.*, 2008, 2011; Pilbeam *et al.*, 2011; Eshraghi *et al.*, 2011; Machinandiarena *et al.*, 2012). Estudios en Finlandia mostraron que el fosfito de potasio utilizado en invernadero para el control de *P. sparsa* en *Rubus articus* solamente tuvo un control moderado, comparado con otros fungicidas con distintos mecanismo de acción (Hukkanen *et al.*, 2008). Otro producto que está dentro del grupo de los fosfonatos es el fosetil aluminio, Gisi (2002), reporta que este producto controla la mayoría de Oomycetes; en *Rubus fruticosus* y *Rosa* spp.; *P. sparsa* ha sido controlado con fosetil aluminio (O'Neil *et al.*, 2002); y en trabajos realizados para rosa por Quiroga y Arbéláez (2004), el fungicida a base de fosetil aluminio fue el que presentó el valor más bajo de incidencia y severidad de *P. sparsa*, las aplicaciones con este producto fueron cada cuatro días durante cinco semanas, para un total de nueve aplicaciones, este producto fue superior a los demás fungicidas, por ser una sustancia de mayor sistemicidad, lo cual hace que su movilidad proteja otras áreas de la planta; además, por la conversión a ácido fosfónico, esta sustancia reduce la enfermedad, sumado a su actividad fungitóxica propia (Cooke y Little, 2001); sin embargo, se pueden presentar problemas de fitotoxicidad con aplicaciones continuas, manifestándose síntomas como manchas de color café en tallos, hojas cloróticas y hojas más pequeñas que las no tratadas (Quiroga y Arbéláez, 2004).

Otro fungicida para el control de *P. sparsa* es el dimetomorph, un compuesto derivado del ácido cinámico. En experimentos realizados en rosa, los tratamientos con este compuesto mostraron valores de incidencia bajos, que lo posicionan como una alternativa para rotación con otros fungicidas. El modo de acción del dimetomorph es translaminar y su mecanismo de acción es la inhibición de la formación de la pared celular, provocando lisis y muerte de la célula, además exhibe excelente actividad antiesporulante, evitando la formación de oosporas y esporangios (Cohen *et al.*, 1995; Fernández-Northcote *et al.* 2000).

El uso de control biológico para este patógeno es una alternativa que poco se ha utilizado, probado, y reportado, existiendo pocos registros, como los de Rebollar-Alviter *et al.* (2012) que utilizaron *Bacillus subtilis* como rotación en un programa de manejo de *P. sparsa* en *R. fruticosus*, sin embargo, es necesario que estos trabajos se repliquen y se realicen en otros lugares, para poder aseverar que el uso biológicos es una alternativa viable de control.

Las condiciones ambientales son importantes en los procesos de infección del Mildiu vellosa y la construcción de un modelo de pronóstico de Mildiu vellosa que use datos patrones de clima de estaciones climáticas proveería gran flexibilidad para la implementación de un sistema de alerta

(2013) designed a study with the aim to investigate the relationship between monthly climate conditions and the risk of downy mildew in boysenberry, besides developing a risk model disease which quantified the risk of downy mildew in relation to future climate conditions supporting farmers' decisions about fungicide application. This model gave as a result the high risk seasons with a downy mildew incidence higher than 10 % that coincided with those months where the number of hours per day was between 15-20 °C, and the number of days with precipitation over 38.7 %. This model (FPS) was developed using fuzzy sets which were defined as the ratio between high-risk events, temperature, and precipitation conditions. A validation study was done where this FPS model gave a correct identification of seasons with high risk of downy mildew for boysenberry, blackberry and rose, and low risk in seasons when the disease was not observed. The FPS model had a concordance with a significance level of agreement between prediction and observation for these crops ($p = 0.002$). This study showed that favorable seasons for downy mildew outbreak of boysenberry had distinctive patterns of climate, and the FPS model was able to identify seasons of high incidence of the disease. Aegerter *et al.* (2003) developed a regression model to predict the risk of disease caused by *P. sparsa*, which was focused on detection of new infections, in contrast to the FPS model that was designed to predict the risk of disease developed at monthly intervals (Kwang *et al.*, 2013).

Crop nutrition is key for treatment of pathogens like *P. sparsa* in rose cultivars. According to the literature, some nutritional elements such as nitrogen (N), potassium (K), calcium (Ca), boron (B), Silicon (Si) and nutrients ratios such as nitrogen (N): potassium (K) ratio are important in increasing resistance to obligate parasites (Ivancovich, 1996; Krauss, 2001); Castillo *et al.* (2010) reported that the addition of 100 to 200 ppm of silicon (Si) to the standard solution in the Charlotte rose variety, significantly reduced symptoms and downy mildew disease progression, this meant an area under the curve of progress of the disease (ABCPE) of 81.71 versus 100.11 of the normal solution; low nutritional ratios (nitrogen (N)/potassium (K) : 1/3, nitrogen (N)/copper (Cu) : 3090/1, calcium (Ca)/Potassium (K) : 11/25, calcium (Ca)/Magnesium (Mg) : 38/1, calcium (Ca)/Boron (B): 262 /1, maintained low incidence and severity levels of *P. sparsa*; additionally, the nitrogen increment to 150 % of its content in the standard nutrient solution, increased the incidence and severity of the disease mainly in susceptible varieties with ABCPE values of 146.88, versus the standard solution with values of 104.79; manganese increment to 150 % of its content in the standard nutrient solution, reduced the disease with ABCPE values of 75.69; potassium increment to 150 % in the nutrient solution reduced the disease in Malibu (ABCPE of 80.83) and Classy varieties (24.81 ABCPE), but disease increased in the Charlotte variety with ABCPE values of 178.5 (Castillo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The occurrence of rose downy mildew in growing

en áreas en donde los datos no estén disponibles, es así que Kwang *et al.* (2013) diseñaron un estudio que tenía como objetivos investigar la relación entre las condiciones de clima mensuales y el riesgo del Mildiu vellosa en *R. ursinus* × *idaeus*, además de desarrollar un modelo de riesgo de la enfermedad, el cual cuantificaba el riesgo de Mildiu vellosa en relación a condiciones de clima soportando futuras decisiones de agricultores acerca de la aplicación de fungicidas, este modelo dió como resultado altas estaciones de riesgo con una incidencia de Mildiu vellosa mayor al 10 % que coincidieron con los meses en donde el número de horas por día era de temperaturas entre 15-20 °C, y número de días con precipitación de más 38.7 %. Este modelo (FPS), se desarrolló usando juegos difusos, que se definieron como la relación entre los eventos de alto riesgo, la temperatura, y las condiciones de precipitación. Se hizo un estudio de validación en donde este modelo FPS tuvo una identificación correcta de estaciones con alto riesgo de Mildiu vellosa para *R. ursinus* × *idaeus*, zarzamora y rosa, y bajo riesgo en estaciones cuando la enfermedad no fue observada. El modelo FPS tuvo una concordancia con un grado de significancia de acuerdo entre la predicción y observación para estos cultivos ($p = 0.002$). En este estudio se demostró que las estaciones favorables para estallido del Mildiu vellosa de *R. ursinus* × *idaeus* tuvo patrones de clima distintivos, y que el modelo FPS fue capaz de identificar estaciones de alta incidencia probable de la enfermedad. Aegerter *et al.* (2003) desarrolló un modelo de regresión para predecir el riesgo de la enfermedad causado por *P. sparsa*, el cual se centró en detección de nueva infección, en contraste el FPS modelo fue diseñado para predecir el riesgo de la enfermedad desarrollado en intervalos mensuales (Kwang *et al.*, 2013).

La nutrición de los cultivos es un factor determinante para el manejo de patógenos como *P. sparsa* en el cultivo de rosa. De acuerdo a la literatura, algunos elementos nutricionales como Nitrógeno (N), Potasio (K), Calcio (Ca), Boro(Bo), Silicio(Si) y relaciones entre nutrientes como la relación Nitrógeno (N): Potasio (K) son importantes en el aumento de resistencia a parásitos obligados (Ivancovich, 1996; Krauss, 2001); Castillo y colaboradores (2010), manifiestan que la incorporación de 100 a 200 ppm de Silicio (Si) a la solución estándar en rosa variedad Charlotte, redujeron considerablemente los síntomas y el avance de la enfermedad del Mildiu vellosa, esto significó un área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de 81,71 versus la solución normal de 100,11; relaciones nutricionales bajas (Nitrógeno (N)/Potasio (K): 1/3, Nitrógeno (N)/Cobre (Cu): 3090/1, Calcio (Ca)/Potasio (K): 11/25, Calcio (Ca)/Magnesio (Mg):38/1, Calcio (Ca)/Boro (Bo): 262/1, mantuvieron bajos niveles de incidencia y severidad de *P. sparsa*; además, el incremento de nitrógeno a 150 % de su contenido en la solución nutritiva estándar, incrementó la incidencia y severidad de la enfermedad con valores de ABCPE de 146,88, versus la solución estándar con valores de 104,79, principalmente en las variedades susceptibles; el incremento de Manganeso a 150 % de su contenido en la solución nutritiva estándar, redujo la enfermedad con valores de ABCPE de 75,69; el

roses countries such as Colombia, Ecuador and Mexico, represent a significant threat to global production of this ornamental plant. Although disease management is viable under a scheme of Integrated Crop Management (ICM), it is necessary to investigate changes in pathogen populations, environmental factors and pathogen-host interaction to adjust strategies to be used in each producing region.

Further research is needed to clarify taxonomic aspects especially the molecular ones, as well as to explore other genome regions different than ribosomal, in order to determine the characteristics of the *P. sparsa* population structure, variations in virulence and pathogenicity between physiological races, as well as the determinants of pathogenicity of the pseudofungus.

The pressure caused by both national and international markets on a more friendly crop management with the environment, that is cleaner and less dangerous to human health, has allowed small and large scale modern agriculture a major shift to search alternatives that minimize the use of pesticides; the latter, without losing productivity or product quality, and above all without increasing production costs.

An integrated research approach that includes all factors of the disease, knowing the time of product application, critical points in phenological development and that shows the relationship between pathogen, host and environment are essential to sustainably manage and make predictive models for downy mildew of the rose.

Currently there are new options for controlling diseases such as phosphites: potassium phosphite, calcium phosphite, phosphite plus micronutrients and phosphite plus amino acids; elicitors such as chitosan, products such as silicon, and antioxidant compounds such as ascorbic acid, which in recent studies it has shown their potential by controlling and inducing defense responses to pathogens in important crops such as potato, grape, blackberry, chrysanthemum and rose (Walter *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2006; Mora-Herrera *et al.*, 2011; Machinandiarena *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012; Shetty *et al.*, 2012; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012).

Lastly, the research efforts that contribute to the development of sustainable management strategies are a priority to ensure the long term viability of the rose's production industry.

Acknowledgements. The main author thanks to the Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador SENESCYT for the postgraduate scholarship, to the Universidad Autonoma del Estado de Mexico and to the Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

LITERATURA CITADA

- Achar PN. 1997. First report of downy mildew of rose caused by *Peronospora sparsa* in KwaZulu Natal, Southern Africa. Plant Disease. Disease note 81: 695.
- Aegerter BJ, Nuñez JJ and Davis RM. 2002. Detection and management of downy mildew in rose rootstock. Plant Disease 86:1363-1368.
- Aegerter BJ, Nuñez JJ and Davis RM. 2003. Environmental

enriquecimiento de Potasio a 150 % en la solución nutritiva, redujo la enfermedad en las variedades Malibú (ABCPE de 80,83) y Classy (ABCPE de 24,81), pero incrementó la enfermedad en la variedad Charlotte con valores de ABCPE de 178,5 (Castillo *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La ocurrencia del Mildiú vellosa de la rosa en países cultivadores de rosas como Colombia, Ecuador y México, representa una amenaza significativa para la producción mundial de esta planta ornamental. Aunque el manejo de la enfermedad es viable bajo un esquema de manejo integrado del cultivo (MIC), es necesario investigar los cambios en las poblaciones del patógeno, factores ambientales y la interacción patógeno-hospedante, para ajustar las estrategias a emplear en cada región productora.

Se necesitan investigaciones adicionales para aclarar aún más aspectos taxonómicos especialmente moleculares, siendo inminente la necesidad de explorar otras regiones del genoma diferentes de las ribosomales, para determinar las características de la estructura de poblaciones de *P. sparsa*., las variaciones en la virulencia y patogenicidad entre razas fisiológicas, y los determinantes de la patogenicidad del pseudohongo.

La presión ocasionada por los mercados tanto nacionales como internacionales sobre un manejo de los cultivos más amigable con el medio, es decir menos contaminante y menos peligroso para la salud humana, ha permitido que la agricultura moderna pequeña y gran escala de un giro importante para buscar otras alternativas que minimicen el uso de pesticidas; esto último, sin perder la productividad, ni la calidad de los productos, y sobre todo sin elevar los costos de producción.

Un enfoque integrado de investigación que incluya todos los factores de la enfermedad, conociendo los tiempos de aplicación de los productos, puntos críticos en desarrollo fenológico y que reúna las relaciones entre patógeno, hospedante y medio ambiente, son esenciales para manejar de manera sostenible y hacer modelos de predicción o aviso para el Mildiú vellosa de la rosa.

Al momento existen nuevas alternativas para el control de enfermedades como son fosfitos: fosfitos de potasio, de calcio, fosfitos más micronutrientes y fosfitos más aminoácidos; elicitores como el quitosán, productos como el silicio, y compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, que en investigaciones recientes, han demostrado el potencial que pueden brindar al controlar e inducir respuestas de defensa a patógenos en cultivos de importancia como papa, uva, zarzamora, crisantemo y rosa (Walter *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2006; Mora-Herrera *et al.*, 2011; Machinandiarena *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012; Shetty *et al.*, 2012; Rebollar-Alviter *et al.*, 2012).

Finalmente los esfuerzos de investigación que contribuyan al desarrollo de las estrategias de manejo sostenible, son una prioridad para asegurar la viabilidad a largo plazo de la industria de la producción de rosas.

Agradecimientos. El autor principal agradece a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador

- factors affecting rose downy mildew and development of a forecasting model for a nursery production system. *Plant Disease* 87: 732-738.
- Altamiranda EAG, Andreu AB, Daleo GR and Olivieri FP. 2008. Effect of B-aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australasian Plant Pathology* 37: 421-427.
- African Business Magazine. 2012. The global flower trade. Disponible en línea: <http://africanbusinessmagazine.com/special-reports/sector-reports/floriculture/the-global-flower-trade>. (consulta, marzo 2013).
- Agrios GN. 2005. *Plant pathology*. Fifth. Ed. Academic Press Inc. New York. USA. 922 p.
- Arbeláez G. 1999. El mildiú vellosa del rosal ocasionado por *Peronospora sparsa* Berkeley. *Acopaflo* 6: 37-39.
- Ayala VM, Argel RL, Jaramillo VS y Marín MM. 2008. Diversidad genética de *Peronospora sparsa* (Peronosporaceae) en cultivos de rosa de Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 13: 79-94.
- Aziz A, Tritel AP, Dhuicq LJ, Couderchet PM and Vernet G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew disease control and pest management. *Plant Pathology* 61: 120-131.
- Bañón AS, González BGA, Fernández HJA y Cifuentes RD. 1993. Gerbera, liliun, tulipán y rosa. Mundi-Prensa. Madrid. España. 250 p.
- Berkeley JM. 1862. Fungi on rose leaves. *Gardener's Chronicle*: 307-308.
- Blechert O and Debener T. 2005. Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and varios rose species. *Plant Pathology* 54: 82-90.
- Brent K and Hollomon D. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens. 2ed. Published by Fungicide Resistance Action Committee. Brussels. Belgium. 58 p.
- Castillo CF, Álvarez E, Gómez E, Llano GA y Castaño J. 2010. Mejoramiento nutricional de la rosa para el manejo de *Peronospora sparsa* Berkeley, causante del mildiú vellosa. *Rev. Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 34: 137-142.
- Clark JSC and Spencer PPTN. 2004. The compatible interaction in downy mildew infections. In: Spencer, D.M. (ed.). *Advances in Downy Mildews Research*. Kluwer Academics Publishers 2: 1-34.
- Cohen Y, Baider A and Cohen B. 1995. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens. *Phytopathology* 85: 1500-1506.
- Cooke DE, Drenth A, Duncan JM, Wagels G and Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet Biol.* 30: 17-32.
- Cooke L and Little G. 2001. The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight. *Pest Management Science* 58: 17-25.
- Copping LG and Hewitt HG. 1998. *Chemistry and mode of action of crop protection agents*. Cambridge: Royal Soc. Chemistry. 145p.

SENECYT por la beca para estudios de posgrado, a la Universidad Autónoma del Estado de México y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Daayf F, Ongena M, Boulanger RN, El Hadrami I and Bélanger RR. 2000. Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. J Chem. Ecol. 26: 1579-1593.
- Delipoulos T, Kettlewell PS and Hare MC. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A Review. Crop Prot. 29: 1059-1075.
- Dick MW. 2001. Straminipilous fungi. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 670 p.
- Eshraghi L, Anderson J, Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GESTJ and O'Brien PA. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 60:1086-1095.
- Fernández NEN, Navia O and Gandarillas A. 2000. Basis of strategies for chemical control of potato late blight developed by PROINPA in Bolivia. Fitopatologia 35: 137-149.
- Flórez RV. 1996. El papel de las fenilamidas en el manejo del mildew veloso en ornamentales. Acopaflor 3: 30-31.
- Guest D and Grant B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. Biol. Rev. 66: 159-187.
- Gisi U. 2002. Chemical control of downy mildews. pp. 119-159. In: Spencer-Philips, P.N.T., U. Gisi and A. Lebeda (eds). Advances in downy mildew research. Kluwer Academic Publisher, Amsterdam. Holand.
- Göker M, Voglmayr H, Riethmüller A, Weib M and Oberwinkler F. 2003. Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. Can J. Bot. 81: 672-683.
- Göker M, García BG, Voglmayr H, Tellería MT, Martín MP. 2009. Molecular taxonomy of phytopathogenic fungi: A case study in *Peronospora*. PLoS ONE 4: e6319. doi:10.1371/journal.pone.0006319
- Gómez SM y Arbeláez G. 2005. Caracterización de la respuesta de tres variedades de rosa a la infección de *Peronospora sparsa* Berkeley, bajo condiciones de invernadero. Agronomía Colombiana 23: 246-255.
- Grant BR, Dunstan RH, Griffith JM, Niere JO and Smillie RH. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. Australas Plant. Pathol. 19:115-121.
- Hall HK and Gardner CS. 1982. Oospores of *Peronospora sparsa* Berk. on *Rubus* species, New Zealand Journal of Experimental Agriculture 10: 429-432.
- Hardham A. 2009. The asexual life cycle. Oomycetes Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools. Edited by Kurt Lamour and Sophien Kamoun. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. US. 93-94.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC and Pegler DN. 1995. Ainsworth & Bisby's. Dictionary of the Fungi. 8 ed. CAB Internacional. Egham. UK. 616p.
- Hollier CA, Overstreet C and Holcomb GE 2001. Rose diseases. Louisiana State University, Agricultural Center. Louisiana, USA. 2613 p.
- Horst RK and Cloyd RA 2007. Compendium of rose diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 16-18.
- Hukkanen A, Kostamo K, Karelampi S and Kokko H. 2008. Impact of agrochemicals on *Peronospora sparsa* and phenolic profiles in three *Rubus arcticus* cultivars. J. Agric. Food Chem. 56: 1008-1016.
- Ivancovich A. 1996. Manejo de enfermedades. In: Bota, G., A. Ivancovich, L.D. Ploper y I. Laguna (Eds.) Enfermedades de Soja. Manual de Diagnóstico y Manejo, INTA CRBAN EEA Pergamino. 15-32 pp.
- Jackson TJ, Burgess T, Colquhoun I and Hardy GE. 2008. Action of the fungicide Phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 49: 147-154.
- Judelson H. 2009. Sexual reproduction in Oomycetes: Biology, diversity, and contributions to fitness. Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools. Edited by Kurt Lamour and Sophien Kamoun. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. USA 121-122 pp.
- Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. Eukaryotic Cell. 2:191-199.
- King M, Reeve W, Van der Hoek MB, Williams N, McComb J, O'Brien PA and Hardy GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Mol. Genet. Genomics 284: 425-435.
- Krauss A. 2001. Potassium and biotic stress. Presented at the 1st FAUBA-FERTILIZAR-IPI Workshop on Potassium in Argentina's Agricultural Systems. 20-21 November 2001, Buenos Aires, Argentina. International Potash Institute (IPI).
- Kumar RA, Vasu K, Velayudhan KT, Ramachandran V, Suseela Bhai R and Unnikrishnan G. 2009. Translocations and distribution of 32 P. labeled potassium phosphonate in black pepper (*Piper nigrum* L.). Crop Prot. 28: 878-881.
- Kwang SK, Beresford RM and Walter M. 2013. Development of a disease risk prediction model for downy mildew (*Peronospora sparsa*) in boysenberry. Phytopathology. 58: 1-30.
- Lediuk KD, Lorenzo L y Damascos MA. 2010. Primer registro de *Podosphaera pannosa* (Ascomycota) sobre *Rosa canina* en Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 45: 231-233.
- Lindqvist KH, Koponen H, and Valkonen J. 1998. *Peronospora sparsa* on cultivated *Rubus arcticus* and its detection by PCR based on ITS sequences. Plant Dis. 82:1304-1311.
- Lindqvist KH, Koponen H and Valkonen J. 2002. Variability of *Peronospora sparsa* (syn. *P. rubi*) in Finland as measured by amplified fragment length polymorphism. Eur. J. Plant Pathol. 108: 327-335.

- Lobato MC, Olivieri FP, González AEA, Wolski EA, Daleo GR, Caldiz DO and Andreu AB. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 349-58.
- Lobato MC, Machinandiarena MF, Tambascio C, Dosio GAA, Caldiz DO and Daleo GR. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 155-63.
- Lyr H. 1995. Modern selective fungicides-properties, applications, mechanisms of action. New York: Gustav Fischer Verlag. 595 p.
- Macnish AJ, Morris KL, Theije MGJ, Boerrigter HAM, Reid MS, Jiang CZ and Woltering EJ. 2010. Sodium hypochlorite: A promising agent for reducing *Botrytis cinerea* infection on rose flowers. *Postharvest Biology and Technology* 58: 262-267.
- McDonald AE, Grant BR and Plaxton WC. 2001. Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* 24: 1505-1519.
- Machinandiarena M, Lobato M, Feldman M, Daleo G and Andreu A. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 169: 1417-1424.
- Michelmore RW, Ilott T, Hulbert SH and Farrara B. 1988. The downy mildews. *Advances in Plant Pathology* 6: 55-76.
- Mora HME, Peralta VJ, López DHA, García VR, González DJG. 2011. Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa en plantas de crisantemo. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 17: 73-81.
- NCBI. 2013. Taxonomy browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=169388&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlocked>. (consulta, febrero 2013).
- Nuninger C, Watson G, Leadbitter N, and Ellgehausen H. 1996. CGA329341: Introduction of the enantiometric form of the fungicide metalaxyl. Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases 1: 263-268.
- O'Neil TM, Pye D and Locke T. 2002. The effect of fungicides, irrigation and plant density on the development of *Peronospora sparsa*, the cause of downy mildew in rose and blackberry. *Ann. Appl. Biol.* 140: 2007-2214.
- Pilbeam RA, Howard K, Shearer BL and Hardy GESJ. 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees Struct Funct.* 25: 1121-1131.
- Quiroga N y Arbeláez G. 2004. Evaluación de la eficacia de fungicidas aplicados al suelo y al follaje para el control de mildew vellosa, ocasionado por *Peronospora sparsa* en un cultivo comercial de rosa. *Agronomía Colombiana* 22: 110-118.
- Quitian A. 1995. Algunos aspectos sobre mildew vellosa y su manejo. *Acopaflor* 2: 25-26.
- Restrepo L F. 1996. Susceptibilidad de las rosas a los mildews. *Acopaflor* 3: 3-6.
- Rebollar AA, Silva RHV and Ellis MA. 2009. First report of *Peronospora sparsa* causing downy mildew (dryberry) of *Rubus fruticosus* in Mexico. *Plant Disease. Disease note* 93: 674.
- Rebollar AA, Silva RHV, López CI, Boyzo MJ and Ellis MA. 2012. Fungicide sprays programs to manage downy mildew (dryberry) of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection* 42: 49-55.
- Riethmüller A, Voglmayr H, Göker M, Weiß M and Oberwinkler F. 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834-849.
- Ritz CM, Maier WF, Oberwinkler F and Wissemann V. 2005. Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dog rose host. *Mycol. Res.* 109: 603-609.
- Robert V, Stegehuis G and Stalpers J. 2005. The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org> (consulta, febrero 2013).
- Shetty R, Jensen B, Shetty P, Hansen M, Hansen CW, Starbey, KR and Jorgensen, HJL. 2012. Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Pathology* 61: 120-131.
- Shibuya N and Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 59: 223-33.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2012. Cierre de la producción agrícola. Disponible en línea: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (consulta, octubre de 2013).
- Tate KG. 1981. Etiology of dryberry disease of boysenberry in New Zealand. *N. Z. J. Crop Exp. Agric.* 9: 371-376.
- Thines M. 2006. Evaluation of characters available from herbarium vouchers for the phylogeny of the downy mildew genera (Peronosporaceae) *Fungal Genet. Biol.* 44: 199-207.
- Virany F. 1988. Changes in pigment constitution of downy mildew sunflower after metalaxyl treatment. *Acta Fitopatológica y Entomológica Húngara* 23: 21-25.
- Walter M, Harris VP, Thomas W, Tate G, Waipara NW and Langford G. 2004. Agrochemicals suitable for downy mildew control in New Zealand boysenberry production. *Crop Prot.* 23: 327-333.
- Wilkinson CJ, Shearer BL., Jackson TJ and Hardy GESJ. 2001. Variation in sensitivity of western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant. Pathol.* 50: 9-83.
- Williamson B, Breese WA and Shattock RC. 1995. A histological study on downy mildew (*Peronospora rubi*) infection of leaves, flowers and developing fruits of tummelberry and other *Rubus* spp. *Mycological Research* 99: 1311-1316.
- Wheeler B. 1981. Downy mildew of ornamentals. Chapter 22 *In: Spencer, D.M. (ed.). The Downy Mildews.* Academic Press, London. England. 476-477.
- Whitaker VM and Hokanson SC. 2009. Breeding Roses for disease resistance. *Plant Breeding Reviews.* Edited by Jules Janick. St. Paul MN USA 31: 277-329.

El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas

The Genus *Aspergillus* and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives

Hadassa Yuf Martínez Padrón, Sanjuana Hernández Delgado, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, México; **César Augusto Reyes Méndez y Gricelda Vázquez Carrillo**, Campos Experimentales Río Bravo y Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Correspondencia: hadassayuf@gmail.com

(Recibido: Junio 18, 2012 Aceptado: Diciembre 19, 2013)

Martínez Padrón HY, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA y Vázquez Carrillo G. 2013. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 126-146.

Resumen. El maíz es el cultivo más importante de México de acuerdo con la superficie cultivada anualmente y su consumo per cápita. Las pérdidas en la producción del grano se asocian con su manipulación durante la cosecha en el campo, almacenaje, transporte y procesamiento para el consumo humano o animal. El grano de maíz posee una microbiota particular de bacterias, insectos y hongos que pueden causarle daños. Entre ellos, el género fúngico *Aspergillus* y, de éste, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más importantes porque producen aflatoxinas que provocan gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado. Actualmente, las regulaciones mexicanas establecen límites permisibles sólo para aflatoxinas en cereales y sus productos, excluyendo otras micotoxinas. Las condiciones de producción de maíz en climas tropicales y subtropicales, particularmente en el noreste de México, favorecen las infecciones por hongos toxígenos. Por ello, es necesario la identificación e implementación de estrategias que reduzcan la contaminación en el grano. Entre ellas, destacan el uso de híbridos de maíz con resistencia a sequía, plagas, enfermedades y altos rendimientos de grano (H-436, 437, 439, 443A); manejo integrado de insectos y hongos mediante tratamiento químico, cultural o biológico y la modificación del procesamiento del grano para consumo humano (nixtamalización). Dichas medidas, individualmente o en conjunto, reducirán paulatinamente los daños causados por hongos potencialmente toxígenos en la planta de maíz y el consumidor final en México. En este trabajo presentamos una perspectiva de la investigación

Abstract. Maize is the major crop in Mexico according to the annually cultivated area and its per capita consumption. The losses on grain production are associated with handling during field harvest, storage, transportation, and processing for either human or animal consumption. The maize grain has particular pests associated such as bacteria, insects and fungi that can cause damage. Among them, the fungal genus *Aspergillus* and particularly species *A. flavus* and *A. parasiticus* are outstanding due to their production of aflatoxins which cause a broad variety of toxic effects on living organisms exposed to contaminated grains. Currently, Mexican regulations establish maximum limits of aflatoxins in cereal products, but other mycotoxins are excluded. The production conditions for maize in tropical and subtropical environments, particularly in northeastern Mexico, favor infections by toxigenic fungi. Therefore, it is necessary to identify and implement strategies that can reduce grain fungal contamination. Among them, stand out the use of maize hybrids with resistance to drought, pests, diseases, and high grain yield (H-436, 437, 439, 443A); integrated management of insects and fungi by chemical, cultural and/or biological treatment; and modifications of grain processing for human consumption ('flour-making'). Such measures will individually or together gradually reduce damage caused by potentially toxigenic fungi to the maize plant and ultimately to the consumer in Mexico. Here, we present an overview of current research about aflatoxigenic fungi in maize in Mexico, their implications on both human and cattle health, the tools (phytopathology, genetics of both the host and the pathogen, biochemistry, among others) to study this problem as well as those strategies for integrated management in order to date and to weight all data published until now, and then, establish essential points for further research.

Additional keywords: Aflatoxins, Integrated Pest Management Strategies, Aflatoxigenic fungi, *Zea mays* L.

actual en el tema de los hongos aflatoxigénicos en maíz con énfasis en México, sus implicaciones en salud humana y del ganado, las herramientas (fitopatológicas, genéticas del hospedante y el patógeno, bioquímicas, entre otras) de estudio del problema, así como las estrategias de manejo integrado utilizadas, para actualizar y ponderar la información generada a la fecha, y establecer puntos esenciales para futuras investigaciones.

Palabras clave adicionales: Aflatoxinas, Estrategias de Manejo Integrado, Hongos Aflatoxigénicos, *Zea mays* L.

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta nativa de México que actualmente se destina para la alimentación humana y del ganado, además de su aprovechamiento industrial. El consumo per cápita de maíz es de aproximadamente 160 g por día en forma de tortillas, principalmente (ASERCA, 2012). En el 2012 se produjeron en México más de 22 millones de toneladas de maíz (SIAP, 2014). Sin embargo, los volúmenes y la calidad de la producción de maíz en nuestro país son limitados debido principalmente a la incidencia de plagas y enfermedades, y por factores abióticos como altas y bajas temperaturas, la salinidad de los suelos, la deficiencia de nutrimentos en los suelos y la sequía (Moreno y González, 2011).

Los hongos que comúnmente atacan al maíz tanto en campo como en almacén pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; estos organismos son productores potenciales de micotoxinas (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (García y Heredia, 2006).

La producción de aflatoxinas es favorecida tanto por factores que ocurren en campo como en almacén (Devreese *et al.*, 2013). En campo, la producción de aflatoxinas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas y los daños a la planta hospedante producidos por insectos de la mazorca pertenecientes a los géneros *Heliothis* y *Spodoptera* (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, la incidencia de aflatoxinas se ve favorecida por el ataque de plagas insectiles que se desarrollan bajo condiciones específicas como la fecha de siembra, altas densidades de siembra y alta incidencia de malezas (Rodríguez, 1996). En almacén, las condiciones de alta temperatura y humedad, aireación e inóculo primario proveniente del campo también son determinantes en el incremento de la síntesis de aflatoxinas en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007).

En este trabajo se presenta una revisión respecto al estudio de la contaminación con aflatoxinas en el cultivo de maíz, sus implicaciones en salud humana y animal, estrategias de control y de manejo integrado, con el objetivo de actualizar y ponderar la información generada a la fecha, que marque la pauta en la búsqueda de soluciones para disminuir la incidencia y prevalencia de las aflatoxinas en

Maize (*Zea mays* L.) is a Mexican native plant currently intended for human and livestock consumption, besides its industrial use. Maize consumption per capita is about 160 g per day primarily in the form of tortillas, (ASERCA, 2012). In 2012, over 22 million tons of corn were produced in Mexico (SIAP, 2014). However, the volume and quality of maize production in our country is limited mainly due to the incidence of pests and diseases, and abiotic factors such as high or low temperatures, soil salinity, nutrient deficiency in soils and drought (Moreno and González, 2011).

The fungi that commonly attack stored corn and in the field, belong to the genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*; these organisms are potential producers of mycotoxins (Hernandez *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). *Aspergillus* growth and contamination of food products with aflatoxins are the result of the interaction between the fungus, the host and the environment. The interaction of such factors determines the infestation and colonization of the substrate, as well as the type and amount of aflatoxins produced (García and Heredia, 2006).

Aflatoxin production is favored by factors that occur both in the field and during storage (Devreese *et al.*, 2013). In the field, aflatoxin production increases with water stress, high temperatures and damage to the host plant by cob insects belonging to the genera *Heliothis* and *Spodoptera* (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Besides, the incidence of aflatoxin is favored by the attack of insect pests that develop under specific conditions such as planting date, high densities and high incidence of weeds (Rodríguez, 1996). During storage, the conditions of high temperature and humidity, ventilation and primary inoculum from the field are also crucial in increasing the synthesis of aflatoxin in maize grain (Hernández *et al.*, 2007).

In this paper, a review on the study of aflatoxin contamination in maize, its implications for human and animal health, control strategies and integrated management are presented, in order to update and weigh the information generated up to date, that set the guidelines in the search for solutions, to reduce the incidence and prevalence of aflatoxin in such crop, particularly in the case of Mexico, where maize is of very high importance from the ecological, economic, social and cultural point of view.

***Aspergillus* section Flavi.** Most species of the genus *Aspergillus* are saprophytes filamentous fungi that play an essential role in the degradation of organic matter. Their natural habitat is the soil where they survive and develop on decaying matter. This genus is one of the most abundant in nature and can be found in any environment; they reproduce by conidia whose germination originates hyphae. For growth, *Aspergillus* requires a relative humidity between 70- 90 %, water content in seeds between 15- 20 %, and a wide temperature range (0 to 45 °C) (Klich, 2002).

One of the peculiarities of *Aspergillus* species is their ability to produce mycotoxins, in this case, aflatoxins (AF). The basic structure of aflatoxins consists of a dihydridifuran or tetrahydro- difuran ring attached to a coumarin with a ring of five or six carbon atoms. The difuranocoumarin cyclopentanones of AF of series B, M, P and Q are AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁,

dicho cultivo particularmente para el caso de México, donde el cultivo del maíz es de importancia capital desde los puntos de vista ecológico, económico, social y cultural.

Aspergillus sección Flavi. La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Klich, 2002).

Una de las particularidades de las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, en este caso, aflatoxinas (AF). La estructura básica de las aflatoxinas consiste en un anillo dihidro-difurano o tetrahidro-difurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono. Las difuranocumarinas ciclopentanonas de AF de las series B, M, P y Q son las AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁, AFP₁ y AFL. El segundo subgrupo corresponde a las lactonas difuranocumarinas de la serie G como son AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) y D (AFD), éste último derivado del tratamiento de la AFB₁ con amonio. Otro metabolito muy tóxico de la AFB₁ es el aflatoxicol (AFL). Sólo las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se sintetizan naturalmente de la AFB₁; las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y AFL) son hidroxilados producto del metabolismo animal o microbiano. La AFB₁ es la más peligrosa y tóxica de todas (Carvajal, 2013) y es producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas G₁ y G₂ se producen por *A. parasiticus* y *A. nomius*, exclusivamente; aunque Novas y Cabral (2002) reportaron la producción de AFG₁ en algunas cepas Africanas y Argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. Las especies *A. flavus*, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen AFB₁ y AFB₂ (Peterson *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). AFB₂ y AFG₂ son inactivas biológicamente, pero se activan *in vivo* por oxidación a AFB₁ y AFG₁. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son formas hidroxiladas de AFB₁ y AFB₂ respectivamente; mientras que AFB_{2a} y AFG_{2a} son productos 8- y 9-hidratados de B₁ y G_{1,4} (Moudgil *et al.*, 2013). La AFB₁ exhibe toxicidad aguda, seguida de AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Madrigal *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2011). Algunos precursores de aflatoxinas son hidroxiantraquinonas tales como el ácido norsolorínico, averufina, versicolorina A y averantina (Moudgil *et al.*, 2013).

Cabe notar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa, no de la especie. Otra toxina producida por *A. flavus* es el ácido ciclopiazónico, que no ha aflatoxinas (Abbas *et al.*, 2011a). Hongos del género *Aspergillus* también inhiben la germinación de la semilla y producen cambios de color, temperatura (calentamiento),

AFP₁ and AFL. The second subgroup corresponds to difuranocoumarin lactones of G series such as AFG₁, AFG₂ and AFG_{2a}. There are about 20 different types of AF, among the most important for their high carcinogenic, mutagenic and teratogenic potentials are: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) and D (AFD); the latter is derived from AFB₁ treatment with ammonia. Another very toxic AFB₁ metabolite is aflatoxicol (AFL). Only AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ are synthesized naturally from AFB₁; the other AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} and AFL) are hydroxylated products from animal or microbial metabolism. AFB₁ is the most dangerous and toxic of all (Carvajal, 2013) and is produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*. G₁ and G₂ aflatoxins are produced by *A. parasiticus* and *A. nomius*, exclusively; although Novas and Cabral (2002) reported the AFG₁ production in some African and Argentinean strains of *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. The *A. flavus* and *A. pseudotamarii* species as well as some *A. caelatus* strains produce AFB₁ and AFB₂ (Peterson *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). AFB₂ and AFG₂ are biologically inactive but activate *in vivo* by AFB₁ and AFG₁ oxidation. M₁ and M₂ aflatoxins are hydroxylated forms of AFB₁ and AFB₂, respectively; while AFB_{2a} y AFG_{2a} are 8- and 9- hydrated products of B₁ and G_{1,4} (Moudgil *et al.*, 2013). AFB₁ exhibits acute toxicity, followed by AFB₂, AFG₁ and AFG₂ (Madrigal *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2011). Some aflatoxins precursors are hydroxyanthraquinones such as norsolorinic acid, averufin, versicolorin A and averantin (Moudgil *et al.*, 2013).

It is important to mention that the ability to synthesize aflatoxins is characteristic of the strain, and not of the species. Another toxin produced by *A. flavus* is the cyclopiazonic acid, which has not been sufficiently studied as in the case of aflatoxins (Abbas *et al.*, 2011a). Fungi of the *Aspergillus* genus also inhibit seed germination and produce changes in color, temperature (warming), mildew, 'caking' and rotting. In contrast, species such as *A. niger* and *A. oryzae* are industrially relevant and they are used in food fermentations (Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002).

The aflatoxin-producing species that causes higher contamination is *A. flavus* which contains L and S morphotypes. Cotty (1989) indicated that L isolates do not produce or produce very few sclerotia (with a diameter higher than 400 µm) and large amounts of conidia; meanwhile, the S strains produce numerous sclerotia (with a diameter less than <400 µm) and few conidia. Aflatoxins production in L isolates is very variable with some highly toxigenic and some non-toxic isolates, while S isolates produce high and consistent levels of aflatoxins (up to 10,000 µg/kg) (Probst *et al.*, 2010). There is a recent Kenyan report of high incidence of morphotype S causing problems of high incidence of G aflatoxins in maize grown in that country. However, phylogenetic analysis of African (Kenya, Nigeria), American (USA, Argentina), Australian and Asian (Philippines, Thailand) strains, indicated that African strains are genetically closer to the new species named *A. minisclerotigenes*, compared to *A. flavus* strains, and also that they produce exclusively aflatoxins B due to the occurrence of a deletion in the *crypA* gene (Probst *et al.*,

enmohecimiento, ‘apelmazamiento’ y pudrición pudrición. En contraste, especies como *A. niger* y *A. oryzae* son de interés industrial y se utilizan en la fermentación de alimentos (Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002).

La especie productora de aflatoxinas que causa mayores contaminaciones es *A. flavus*, dentro de la cual se han definido dos morfotipos, denominados L y S. Cotty (1989) indicó que los aislamientos L no producen o producen pocos esclerocios mayores a 400 µm y grandes cantidades de conidios; por su parte las cepas S producen numerosos esclerocios con un diámetro menor a 400 µm y pocos conidios. La producción de aflatoxinas en aislamientos L es muy variable con algunos aislamientos altamente toxígenos y otros atoxigénicos, mientras que los aislamientos S producen altas y consistentes concentraciones de aflatoxinas (hasta 10,000 µg/kg) (Probst *et al.*, 2010). En Kenia se reportó recientemente alta incidencia del morfotipo S ocasionando problemas de alta incidencia de aflatoxinas G en maíz cultivado en dicho país. Sin embargo, el análisis filogenético de cepas Africanas (Kenia, Nigeria), así como de América (EUA, Argentina), Australia y Asia (Filipinas, Tailandia) indicó que las cepas Africanas son genéticamente más cercanas a la nueva especie nombrada como *A. minisclerotigenes* en comparación con cepas de *A. flavus* y, además, producen exclusivamente aflatoxinas B debido a la ocurrencia de una deleción en el gen *crypA* (Probst *et al.*, 2012).

En 2005 se liberó la secuencia del genoma de *A. flavus* por el Instituto de Investigación Genómica de Estados Unidos y en 2010 se actualizó dicha secuencia (Cleveland *et al.*, 2009; Payne y Yu, 2010). Posteriormente, se generaron 7218 etiquetas de secuencia expresada (ESTs) únicas de *A. flavus*. El tamaño del genoma de *A. flavus* y de *A. oryzae* es de cerca de 37 Mb distribuidos en ocho cromosomas y que codifican para más de 12 mil genes funcionales (Chang y Ehrlich, 2010; Payne y Yu, 2010). El genoma de *A. flavus* es ligeramente mayor que el de *A. fumigatus* (aproximadamente 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) y *A. nidulans* (31 Mb). A pesar de esta variación en los tamaños de los genomas, todas las especies de *Aspergillus* tienen ocho cromosomas. Un aspecto importante es que *A. flavus* y *A. oryzae* tienen copias extra de genes específicos al linaje. Esas extracopias se localizan por lo general en bloques no sinténicos. Aunque no se han secuenciado sus genomas, con base en estudios cariotípicos se ha sugerido similitud en el tamaño del genoma de *A. parasiticus* y *A. sojae* con respecto a *A. flavus* (Amaike y Keller, 2011).

Producción de aflatoxinas. A pesar de que México es el centro de origen y de diversidad del maíz (Ortega, 2003), dicha diversidad no se ha analizado exhaustiva o consistentemente para identificar genotipos más tolerantes a la contaminación por aflatoxinas. Dado que el maíz es un alimento de importancia mundial, es necesario el monitoreo de la calidad sanitaria, desde el uso de semillas libres de patógenos durante cada una de las etapas del cultivo, hasta la cosecha, e incluso, durante la pos-cosecha (Plasencia, 2004). Es importante señalar que en México la mayor proporción del maíz se cultiva en condiciones de temporal (60 %) (SIAP, 2014) que, en general, es deficiente y errático

2012).

In 2005, the Institute for Genomic Research in the U.S. released the genome sequence of *A. flavus*, and in 2010 this sequence was updated (Cleveland *et al.*, 2009; Payne and Yu, 2010). Later on, 7218 expressed sequence tags (ESTs) unique to *A. flavus* were generated. The genome size of *A. flavus* and *A. oryzae* is about 37 Mb distributed in eight chromosomes and that encode more than 12 thousand functional genes (Chang y Ehrlich, 2010; Payne and Yu, 2010). *A. flavus* genome is slightly larger than that of *A. fumigatus* (about 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) and *A. nidulans* (31 Mb). Despite this variation in the genome size, all *Aspergillus* species contain eight chromosomes. An important aspect is that *A. flavus* and *A. oryzae* have extra copies of lineage-specific genes. These extra copies are located, usually, in non-syntenic blocks. Although their genomes have not been sequenced, based on karyotypic studies, it has been suggested similarity in genome size of *A. parasiticus* and *A. sojae* with respect to *A. flavus* (Amaike and Keller, 2011).

Aflatoxins production. Although Mexico is the center of origin and diversity of maize (Ortega, 2003), this diversity has not been thorough or consistently used to identify more tolerant genotypes to aflatoxins contamination. Since maize is a worldwide important food, it is necessary the monitoring of its sanitary quality, from the use of pathogen-free seeds during each stage of the crop till harvest, and even during the post-harvest (Plasencia, 2004). It is important to note that in Mexico the largest proportion of maize is grown under rain fed conditions (60 %) (SIAP, 2014) that, in general, is poor and erratic and often it results in the coincidence of water stress and high temperatures during reproductive phenological phase, which ultimately favors *Aspergillus* infection in the field (Rodríguez, 1996; Cotty y Jaime-García, 2007).

The toxigenic effects of aflatoxins produced by *Aspergillus* ranges from carcinogenic, teratogenic or mutagenic to the production of hormonal or immunosuppressive disorders; which in turn depends on aflatoxin, dose, exposure time or exposed organism (Carvajal, 2013). The main problem is that aflatoxins are cumulative so that once grain, agricultural product in the field or stored grain are contaminated, they survive to digestion, the heat of cooking or freezing temperatures. Aflatoxins are ingested by humans not only through grains, seeds or fruits, they are also present in milk or meat from animals raised on contaminated food (Requena *et al.*, 2005).

In Mexico, most studies have been limited to record *Aspergillus* incidence, aflatoxins quantification, as well as the identification to the genus level, of the fungi present in the maize grain (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). Particularly in the northern state of Tamaulipas, one of the most important maize growing areas in Mexico, more than 230,000 ha per year are cultivated, and in the last decade about 100,000 ha of maize are sown annually (Reyes and Cantu, 2006). In that same region, *Aspergillus* incidence is common, and sometimes so intense, that has led to rethink the technology of maize cultivation in the region, based on the development or adaptation of management strategies

y que frecuentemente redundan en la coincidencia de estrés hídrico y altas temperaturas durante la fase fenológica reproductiva, lo que finalmente favorece la infección de *Aspergillus* en campo (Rodríguez, 1996; Cotty y Jaime-García, 2007).

El efecto toxígeno de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* varía desde los carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos hasta la producción de desórdenes hormonales o inmunosupresores; lo que a su vez depende de la aflatoxina, dosis, tiempo de exposición u organismo expuesto (Carvajal, 2013). El problema principal reside en que las aflatoxinas son acumulativas de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento. Las aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no sólo a través de granos, semillas o frutos; también se presentan en la leche o la carne de animales criados con alimentos contaminados (Requena *et al.*, 2005).

En México la mayoría de los estudios se han limitado a registrar la incidencia de *Aspergillus* y la cuantificación de las aflatoxinas, así como la identificación a nivel de género de los hongos presentes en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). Particularmente en el norte del estado de Tamaulipas, una de las zonas maiceras más importantes de México, se llegaron a cultivar más de 230 mil ha al año y en la última década en promedio se siembran anualmente unas 100 mil ha con maíz (Reyes y Cantú, 2006). En esa región, la incidencia de *Aspergillus* es frecuente y en ocasiones de tal intensidad que ha llevado a replantear la tecnología del cultivo del maíz en la región basada en el desarrollo o la adecuación de estrategias para su manejo (Reyes y Cantú, 2006; Díaz-Franco y Montes-García, 2008). El género *Aspergillus* ocurre con mayor frecuencia en maíz almacenado para consumo, mientras que en campo la mayor incidencia la presenta *Fusarium* (Hernández *et al.*, 2007). Por su parte, Montes *et al.* (2009) identificaron a *A. flavus* y *A. niger* en híbridos con grano blanco o amarillo, donde éstos últimos exhibieron mayores porcentajes de infección. Alvarado *et al.* (2010) detectaron alta concentración de aflatoxinas en siembras con una alta densidad de población de maíz (siembra en camas y concentraciones de 20.8 µg/kg); sin embargo, el riego por goteo redujo casi a la mitad las infecciones por *A. flavus* (concentraciones de aflatoxinas de 11.1 µg/kg). En la ciudad de Monterrey se analizaron muestras de maíz tomadas de diferentes puntos de distribución y se detectó a AFB₁ en un rango de 5.03 a 465.31 ng/g y AFG₁ en concentraciones de 1.59 a 57.1 ng/g. De las 41 muestras analizadas, 87.8 % estaban contaminadas con aflatoxinas y 58.5 % contenía niveles por encima de los límites legales permitidos en México (Torres *et al.*, 1995). Por su parte, Bucio *et al.* (2001) analizaron maíz almacenado en Guanajuato y concluyeron que la contaminación por aflatoxinas no se asocia con las condiciones del cultivo sino con las condiciones inadecuadas de almacenamiento del grano. En el estado de Sonora, México, de 66 muestras de maíz almacenadas siete registraron concentraciones de AFB₁ menores a las permitidas la NOM 247-SSA1-2008 (Ochoa *et al.*, 1989) y en 111 muestras de 'pozol' de mercados locales de Chiapas se

(Reyes and Cantú, 2006; Díaz-Franco y Montes-García, 2008). *Aspergillus* genus occurs more frequently in stored corn for consumption, while the highest incidence in the field is *Fusarium* (Hernández *et al.*, 2007). Meanwhile, Montes *et al.* (2009) identified *A. flavus* and *A. niger* in hybrids with white or yellow corn, where the latter showed higher rates of infection. Alvarado *et al.* (2010) detected high aflatoxins concentrations in crops with a high maize population density (planting in beds and 20.8 µg/kg concentration); however, drip irrigation reduced by almost half the *A. flavus* infections (11.1 µg/kg aflatoxin concentration). In Monterrey, maize samples collected from different distribution centers were analyzed; AFB₁ was detected in concentrations ranging from 5.03 to 465.31 ng/g and AFG₁ from 1.59 a 57.1 ng/g. From the 41 samples analyzed, 87.8 % was contaminated with aflatoxins and 58.5 % contained levels above permitted legal limits in Mexico (Torres *et al.*, 1995). Meanwhile, Bucio *et al.* (2001) analyzed stored corn in Guanajuato and they concluded that aflatoxins contamination is not related to crop conditions, but to inadequate grain storage conditions. In Sonora state, Mexico, from 66 samples of stored corn, 7 of them had AFB₁ concentrations lower than those permitted by Mexican norm NOM 247-SSA1-2008 (Ochoa *et al.*, 1989) and in 111 samples of Chiapas local markets of 'pozol' maize grains, 19 samples with AFB₂ were detected with 0.5 to 21 µg/kg levels and AFB₁ traces (Méndez *et al.*, 2004). Despite the consistency of aflatoxins detection in vegetative or semi-processed corn samples, the concentrations are variable depending on sample origin, environmental or storage conditions, germplasm, etc. (Jaime-García y Cotty, 2010). However, it can't be denied that aflatoxin accumulation and their harmful effects on the end consumer, remain dormant (Carvajal, 2013).

Mode of action of aflatoxins. Biologically, aflatoxins behave as immunosuppressants that inhibit phagocytosis and protein synthesis, and they disrupt formation of DNA, RNA and proteins in the ribosome (Carvajal, 2013). For this reason, the International Agency for Research on Cancer, (IARC, 2013), in 1988 classified aflatoxins in the group 1 of mycotoxins which includes substances or mixtures with high carcinogenic potential in humans.

When food contaminated with B₁ aflatoxin is ingested, it is first absorbed in the small intestine, and then, it is transported to the blood, where the red blood cells and plasma proteins carry it to the liver. In the liver cells, the toxin is metabolized in the endoplasmic reticulum and it transforms into the P₁, M₁, Q₁ aflatoxins because the molecule hydroxylates. During such chemical reaction, the toxin B1-8,9-epoxide is formed, and it can be detoxified by a transferase forming a conjugate with glutathione in the thiol form (GSH). Aflatoxins are mutagenic because their structure is related to nucleic acids and proteins and binds to them via covalent bonds. These bonds cause disruptions in the transcription and translation and they generate the formation of a DNA adduct known as B₁-guanine aflatoxin and lipid peroxidation. For this reason, aflatoxins at the cellular level, cause inhibition of DNA, RNA, mitosis and

detectaron 19 muestras con AFB₂ con niveles de 0.5 a 21 µg/kg, así como trazas de AFB₁ (Méndez *et al.*, 2004). A pesar de la consistencia en la detección de aflatoxinas en muestras vegetales o semi-procesadas de maíz, las concentraciones son variables dependiendo del origen de la muestra, condiciones de almacenamiento o ambientales, germoplasma, etc. (Jaime-García y Cotty, 2010). No obstante, no se puede soslayar que la acumulación de aflatoxinas y sus efectos nocivos en el consumidor final permanecen latentes (Carvajal, 2013).

Modos de acción de las aflatoxinas.

Biológicamente, las aflatoxinas se comportan como inmunosupresores que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica e interrumpen la formación del DNA, RNA y las proteínas en el ribosoma (Carvajal, 2013). Por tal razón, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, IARC (2013) por sus siglas en inglés, en 1988 clasificó a las aflatoxinas en el grupo I de micotoxinas que incluye sustancias o mezclas de ellas con alto poder cancerígeno en humanos.

Cuando se ingiere un alimento contaminado con aflatoxina B₁, ésta primero se absorbe en el intestino delgado y luego es transportada en la sangre, donde los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas la conducen hacia el hígado. En las células hepáticas la toxina se metaboliza en el retículo endoplasmático para transformarse en las aflatoxinas P₁, M₁, Q₁ debido a que la molécula se hidroxila. En dicha reacción se forma paralelamente la toxina B₁-8,9-epóxido que puede detoxificarse por una transferasa formando un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH). Las aflatoxinas son mutagénicas debido a que su estructura es afín a los ácidos nucleicos y proteínas y se une a ellos mediante enlaces covalentes. Estos enlaces ocasionan interrupciones en la transcripción y traducción y generan la formación de un aducto de DNA llamado aflatoxina B₁-guanina y peroxidación de lípidos. Por tal razón las aflatoxinas, a nivel celular, ocasionan la inhibición del DNA, RNA, mitosis, alteraciones cromosómicas, que a su vez redundan en efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Carvajal, 2013; Moudgil *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas se sintetizan por la ruta metabólica de los policétidos mediante reacciones de condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, que permiten formar una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bis-dihidrofurano y a una ciclopentanona (Guzmán-de Peña, 2007; Carvajal, 2013). Guzmán-de Peña (2007) señala que las aflatoxinas se forman por la condensación de la acetil-coenzima A y la malonil-coenzima A, produciendo la acetil-S coenzima A, molécula iniciadora de la AFB₁. Dentro de la ruta biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB₁ y que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bis-furano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva. Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y 15 intermediarios. A nivel molecular se ven involucrados 25 genes en los pasos de

chromosomal alterations, which in turn result in carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects (Carvajal, 2013; Moudgil *et al.*, 2013).

Aflatoxins are synthesized via polyketides metabolic pathway through condensation, oxidation, reduction, alkylation and halogenation reactions that allow to form a molecule consisting of a coumarin ring bonded to a bis-dihydrofuran unit and to a cyclopentanone (Guzmán de Peña, 2007; Carvajal, 2013). Guzmán de Peña (2007) reported that aflatoxins are formed by condensation of acetyl-coenzyme A and malonyl coenzyme A, producing S-acetyl coenzyme A, which is the AFB₁ initiator molecule. In the biosynthetic pathway, the versicolorine A formation is particularly relevant, because it is the first molecule in the AFB₁ pathway, and it has a double bond in the 8,9 position of the bis-furan molecule. This double bond is the target for the activation of a highly reactive molecule. During synthesis at least 23 enzymatic reactions and 15 intermediaries occur. At molecular level, 25 genes are involved in inter conversion steps, which have been sequenced, confirmed by gene disruption and enzymatic studies, and are clustered in a DNA region of 70 kb.

At molecular level, more than 25 genes clustered in a 70 kb region, encode the enzymes and regulatory proteins of the aflatoxin synthesis in *A. flavus* and *A. parasiticus*. Among them, *hexA*, *hexB* y *pksA* genes are larger than 5 kb and they encode the alpha subunit of fatty acid synthase (5.8 kb); beta subunit of same synthase (of 5.1 kb) and polyketide synthase (6.6 kb), respectively. In the meantime, the 22 genes involved have an average size of 2 kb. A region of approximately 2 kb with no open reading frame presumably determines the beginning of the cluster of genes (Ehrlich *et al.*, 2005; Amare y Keller, 2014).

Aflatoxin biosynthesis is affected by genetic and environmental factors. The *aflR* gene is positively regulated and it encodes a protein coupled to DNA with a "zinc fingers" specific sequence; such gene is necessary for transcription of most aflatoxin structural genes (Bhatnagar *et al.*, 2006). Then, the *aflJ* (or *aflS*) gene, adjacent to *aflR* is associated with the expression of *pksA*, *nor1*, *ver1* and *omtA* (Chang, 2003; Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Yu *et al.*, 2009; Amare y Keller, 2014). Moreover, the location on the chromosome and some global transcription factors mediated by nitrogen, carbon or pH regulated, also affect the expression of the aflatoxin structural genes. Nitrogen and carbon sources, pH, temperature, availability and activity of the water and plant metabolites, affect aflatoxins synthesis (Bhatnagar *et al.*, 2006) and they are directly associated to the corresponding metabolic pathways, because when the fungus is under stress due to heat or moisture, the aflatoxins are synthesized in small quantities; under favorable environmental factors, the synthesis and the expression profiles of the genes directly associated to such synthesis are increased, since the ratio of the expression *aflR/aflJ* correlates with the increase of aflatoxins biosynthesis (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Recent microarray studies have shown that the *A. flavus* genome contains 56 secondary metabolic clusters (Georgianna *et al.*, 2010) besides a Kojic acid cluster

inter conversión, los cuales han sido secuenciados, confirmados por disrupción génica y por estudios enzimáticos y están agrupados en una región del DNA de 70 kb.

A nivel molecular, más de 25 genes conglomerados en una región de 70 kb codifican las enzimas y proteínas reguladoras de la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre ellos, los genes *hexA*, *hexB* y *pksA* son mayores a 5 kb y codifican la subunidad alfa de la sintasa de ácidos grasos (de 5.8 kb); la subunidad beta de la misma sintasa (de 5.1kb) y la sintasa de poliquétidos (de 6.6 kb), respectivamente. Por su parte, los 22 genes involucrados tienen un tamaño promedio de 2 kb. Una región de aproximadamente 2 kb sin marco de lectura abierto identificable presumiblemente determina el inicio del conglomerado de genes (Ehrlich *et al.*, 2005; Amare y Keller, 2014).

La biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales. El gen *afTR* es positivamente regulado y codifica una proteína acoplada a DNA con secuencia específica de 'dedos de zinc'; dicho gen es requerido para la transcripción de la mayoría de los genes estructurales de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006). Luego, el gen regulador *afII* (o *afIS*), adyacente a *afTR*, se asocia con la expresión de *pksA*, *nor1*, *ver1* y *omtA* (Chang, 2003; Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Yu *et al.*, 2009; Amare y Keller, 2014). Adicionalmente, la ubicación en el cromosoma y algunos factores de transcripción global mediados por nitrógeno, carbono o regulados por pH también afectan la expresión de los genes estructurales de aflatoxinas. Las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH, la temperatura, la disponibilidad y actividad del agua y metabolitos de las plantas afectan la síntesis de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006) y están directamente asociadas en las rutas metabólicas correspondientes, pues cuando el hongo se sujeta a condiciones de estrés por calor o humedad, las aflatoxinas se sintetizan pero en cantidades mínimas; bajo combinaciones favorables de ambos factores ambientales se incrementa la síntesis y los perfiles de expresión de los genes directamente asociados a dicha síntesis, dado que la relación de expresión entre *afTR/afII* se correlaciona con el incremento en la biosíntesis de las aflatoxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Recientes estudios con microarreglos revelan que el genoma de *A. flavus* contiene 56 conglomerados metabólicos secundarios (Georgianna *et al.*, 2010), además del conglomerado de ácido kójico (Marui *et al.*, 2011). Estudios bioinformáticos basados en el algoritmo para la detección *de novo* de motivos independientes (MIDDAS-M) permitieron identificar conglomerados adicionales a los reportados por Georgianna *et al.* (2010) (Umemura *et al.*, 2013). Del total de conglomerados, cuyo número completo aún se desconoce, al menos ocho se han caracterizado parcial o completamente, tales como el de los genes de biosíntesis de aflatoxinas, que se localiza entre los conglomerados de genes de utilización de azúcares y del ácido ciclopiazónico (Amare y Keller, 2014).

Por otra parte, la pérdida de toxicidad se basa en la presencia de mutaciones puntuales o deleciones en el

(Marui *et al.*, 2011). Bioinformatic studies based on the Motif-Independent *De Novo* Detection Algorithm (MIDDAS-M) allowed to identify additional clusters to those reported by Georgianna *et al.* (2010) (Umemura *et al.*, 2013). From total number of clusters, whose full number is still unknown, at least eight have been partially or completely characterized, such as that of the aflatoxin biosynthesis genes, which is located between the gene clusters of sugar utilization and the cyclopiazonic acid (Amare and Keller, 2014).

On the other hand, the loss of toxicity is based on the presence of specific mutations or deletions in the gene cluster described (Chang *et al.*, 2005). For example, in the AF36 atoxigenic strain there is a replacement of G for A at the nt591 site of the polyketide synthase gene, introducing a termination codon in the position 176 of the gene, stopping the enzymatic synthesis and aflatoxins accumulation (Ehrlich y Cotty, 2004). In turn, the NRRL21882 strain has a deletion in the complete gene cluster from the *hexA* coding region in the group of sugar utilization genes to the telomeric region (Chang *et al.*, 2005). Lastly, Criseo *et al.* (2008) observed non-toxicogenic *A. flavus* strains in the whole group of genes that have toxicogenic strains. In this case, atoxigenicity was explained due to defects at the molecular level such as post-translational or protein modifications, although there is no complete evidences about this.

Aflatoxins are low soluble in water, but very soluble in chloroform, methane, acetonitrile or acetone aqueous solutions, because crystals of aflatoxins do not have the same properties than natural aflatoxins. Furthermore, in pure state, they are light and air unstable as well as susceptible to alkaline hydrolysis; they are affected by ammonia or sodium hypochlorite (pH > 10.5), they are heat resistant and stable in a pH range between 3 and 10, odorless, colorless, tasteless and chemically stable in foods and resistant to degradation under normal cooking procedures and difficult to remove once they occur (Guzman-De Peña, 2007; Carvajal, 2013).

Implications in human and animal health.

Aflatoxins are mainly present in agricultural products as raw materials for livestock food preparation as contaminants, or as toxic waste of such animal exploitation like milk, eggs or meat (Requena *et al.*, 2005).

Aflatoxins incidence in humans and livestock food has been studied in several countries (Robledo *et al.*, 2001; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Hong and Yusof, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Stojanovska-Dimzoska *et al.*, 2013) and, in general, they are linked to the development of liver and lung cancer in humans (Liu and Wu, 2010; Wild and Gong, 2010; Carvajal, 2013; Aliabadi *et al.*, 2013; Magnussen and Parsi, 2013; Moudgil *et al.*, 2013). Liu and Wu (2010) analyzed between 550 and 600 thousand worldwide cases of patients with liver cancer mainly in sub-Saharan Africa, Southeast Asia and China, and they found that between 4.6 and 28.2 % of these cases are directly associated to aflatoxin over-exposure (25-155 thousand cases). In Mexico, research on the implications and effects of aflatoxins in humans became more important after the 90's because consumption of contaminated food with AFM₁ animal by milk-producers,

conglomerado de genes descrito (Chang *et al.*, 2005). Por ejemplo, la cepa atoxigénica AF36 muestra un reemplazo de G por A en el sitio nt591 del gen de sintasa de poliquétido, introduciendo un codón de terminación en la posición 176 del gen, deteniendo la síntesis enzimática y acumulación de aflatoxinas (Ehrlich y Cotty, 2004). A su vez, la cepa NRRL21882 presenta una delección en el conglomerado de genes completo desde la región codificadora de *hexA* en el grupo de genes de utilización de azúcares a la región telomérica (Chang *et al.*, 2005). Finalmente, Criseo *et al.* (2008) observaron cepas de *A. flavus* no toxigénicas con todo el grupo de genes que presentan las cepas toxigénicas. En este caso, la atoxigenicidad se explicó debido a defectos a nivel molecular como modificaciones post-transcripcionales o proteínicas, aunque aún no se tienen los elementos completos al respecto.

Las aflatoxinas exhiben baja solubilidad en agua, pero son solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo o acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de la aflatoxinas naturales. Además, son relativamente inestables a la luz y al aire en estado puro y susceptibles a la hidrólisis alcalina; son afectadas por amoníaco o hipoclorito de sodio (pH>10.5); termo-resistentes y estables en un rango de pH entre 3 y 10; inodoras, incoloras e insípidas; así como químicamente, estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales y de difícil eliminación una vez que se producen (Guzmán-De Peña, 2007; Carvajal, 2013).

Implicaciones en salud humana y animal. Las aflatoxinas se encuentran principalmente en productos agrícolas como las materias primas para la preparación de alimentos balanceados para ganado en forma de contaminantes o bien, como residuos tóxicos de los productos de dicha explotación zootécnica como la leche, huevo o carne (Requena *et al.*, 2005).

La incidencia de las aflatoxinas en alimentos para humanos y para ganado se ha estudiado en diversos países (Robledo *et al.*, 2001; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Hong y Yusof, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Stojanovska-Dimzoska *et al.*, 2013) y, en general, se asocian con el desarrollo de cáncer de hígado y de pulmón en humanos (Liu y Wu, 2010; Wild y Gong, 2010; Carvajal, 2013; Aliabadi *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013; Moudgil *et al.*, 2013). Liu y Wu (2010) analizaron entre 550 y 600 mil casos a nivel mundial de pacientes con cáncer de hígado principalmente reportados en África sub-Sahariana, Sureste Asiático y China, determinaron que entre 4.6 y 28.2 % de dichos casos se asocian directamente con la sobre-exposición a las aflatoxinas (25-155 mil casos). En México, la investigación de las implicaciones y efectos de las aflatoxinas cobró mayor importancia a partir de la década de 1990 debido a que el consumo de alimentos contaminados con AFM₁ por animales productores de leche representa un riesgo potencial a la salud pública, particularmente en la población infantil. En 40 hatos lecheros del estado de Jalisco se detectaron 92 % de raciones alimenticias contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg) y el 80 % de leche cruda producida por los mismos estaban

posea un potencial riesgo a la salud pública, particularmente la población infantil. En Jalisco, de 40 hatos lecheros, 92 % de las raciones de alimento fueron encontradas contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg), y el 80 % de la producción de leche cruda fue contaminada con M₁ aflatoxina (0.006 a 0.065 µg/L leche) (Reyes *et al.*, 2009). En México, de 35 muestras comerciales (perros y gatos) de 12 marcas diferentes, se detectaron siete aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ y P₁) con altas concentraciones en dos muestras (72.4 y 597 µg/kg alimento). La B₁ aflatoxina se encontró en el 100 % de las muestras de alimento de gato y el 79 % de las de alimento de perro. Las muestras con mayores niveles de AFB₁ y AFM₁ utilizaron maíz como el ingrediente principal en sus formulaciones (Sharma y Márquez, 2001).

La asociación de mutaciones en el codón 249 del gen *p53* (Moudgil *et al.*, 2013) se evaluó en células de carcinoma de hígado de pacientes en Monterrey, México, detectando antígenos de hepatitis B y/o C y la mutación, en 3 de 16 casos, del gen *p53* y concentraciones de 0.54 a 4.64 pmol de AFB₁- lisina /mg albúmina. Antígenos de hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. Bajo estas condiciones, incluso a niveles relativamente bajos de AFB₁, puede resultar en una situación de alto riesgo dada la exposición diaria (Soini *et al.*, 1996). Resultados similares a nivel molecular se reportan en pacientes de Senegal (Coursaget *et al.*, 1993), Estados Unidos, Tailandia y China (Aguilar *et al.*, 1994) y China (Jackson *et al.*, 2003). Carvajal *et al.* (2012) encontró una fuerte conexión entre aflatoxinas y Virus del Papiloma Humano (VPH) tipos 16 y 18 en cáncer cervical; también verificaron la presencia de tumores cancerosos (hígado, colon, pulmón y páncreas) y orina de pacientes con cirrosis viral, hepatitis B y C y concluyeron que las aflatoxinas actúan como cofactores que mejoran la incidencia de enfermedades en organismos.

Regulaciones sanitarias. México ha desarrollado normativas para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008, la norma mexicana, NOM-247-SSA1-2008, fue publicada y establece que el nivel máximo permisible de aflatoxina en cereales es 20 µg/kg para el consumo humano y animal; además, proporciona especificaciones para el transporte y almacenamiento de cereales y especifica que el límite máximo para aflatoxina en maíz molido y tortilla de maíz es 12 µg/kg (NOM-247-SSA1-2008). Sin embargo, es importante señalar que no existen regulaciones similares para otros micotoxinas comúnmente encontradas en productos agrícolas como las fumonisinas o ocratoxinas (Li *et al.*, 2011), o para el más tóxico aflatoxina, B₁, o M₁ en productos lácteos. Esto confirma que es esencial implementar estudios para generar conocimiento sobre estos micotoxinas con el fin de desarrollar y validar nuevas regulaciones para manejarlos, junto con la emisión de sus respectivas legislaciones. Actualmente, límites han sido establecidos para aflatoxinas permISIBLES en los países importadores y exportadores de productos agrícolas en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos 20 µg/kg es permitido en alimentos y 0.5 µg/kg de M₁ aflatoxina en leche (FDA-USA, 2012); en la Unión Europea, se permite un máximo de 20 µg/kg de B₁ aflatoxina (EU-EFSA, 2002).

contaminados con aflatoxina M₁ (de 0.006 a 0.065 µg/L de leche) (Reyes *et al.*, 2009). En 35 muestras de alimento para perros y gatos de 12 marcas diferentes en México se detectaron siete aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ y P₁) con concentraciones altas en dos muestras (72.4 y 597 µg/kg de alimento). La aflatoxina B₁ se encontró en 100 % de las muestras de alimento para gatos y 79 % para perros. Las muestras con mayor cantidad de AFB₁ y AFM₁ utilizaban maíz como principal ingrediente en la formulación (Sharma y Márquez, 2001).

La asociación de las mutaciones en el codón 249 del gen *p53* (Moudgil *et al.*, 2013) se evaluó en células de carcinomas hepáticos humanos de pacientes en Monterrey, México, detectándose los antígenos de hepatitis B y/o C y la mutación, en 3 de 16 casos, del gen *p53* y concentraciones de 0.54 a 4.64 pmol de AFB₁-lisina/mg de albúmina. Los antígenos para el virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. En estas condiciones aún las concentraciones relativamente bajas de AFB₁ pueden resultar en una situación de alto riesgo dada la exposición diaria (Soini *et al.*, 1996). Resultados semejantes a nivel molecular se reportan en pacientes de Senegal (Coursaget *et al.*, 1993), Estados Unidos, Tailandia y China (Aguilar *et al.*, 1994) y China (Jackson *et al.*, 2003). Carvajal *et al.* (2012) comprobaron la asociación de las aflatoxinas con el VPH (virus del papiloma humano) de los tipos 16 y 18 en cáncer cérvico-uterino; además verificaron la presencia de tumores cancerígenos (hígado, colon, pulmón y páncreas) y la orina de enfermos con cirrosis viral, hepatitis B y C y concluyeron que las aflatoxinas actúan como cofactores que potencian la incidencia de enfermedades en los organismos.

Regulaciones sanitarias. En México se han desarrollado normativas para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 que indica que el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales es de 20 µg/kg tanto para el consumo humano como de animales; además, aporta información relativa a las especificaciones sanitarias de transporte y almacenamiento de cereales e indica que el límite máximo de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es de 12 µg/kg (NOM-247-SSA1-2008). Sin embargo, es notable observar que no existe una regulación similar a la de las aflatoxinas para otras micotoxinas comúnmente presentes en productos agrícolas tales como las fumonisinas y las ocratoxinas (Li *et al.*, 2011); así como para aflatoxinas específicas como la B₁, la más tóxica, o la M₁ en productos lácteos. Esto indica que es indispensable la implementación de estudios para generar conocimiento relativo a estas micotoxinas para así desarrollar y validar nuevas medidas para el manejo de las mismas, además de la legislación reguladora pertinente. A la fecha se han establecido los límites de aflatoxinas permisibles en los países importadores y exportadores de productos agropecuarios en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos de América se permiten 20 µg/kg en alimentos, 0.5 µg/kg de aflatoxina M₁ en leche (FDA-USA, 2012); en la Unión Europea, sólo se permiten máximo 20 µg/kg de aflatoxina B₁ (UE-EFSA, 2002). El Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (2012) indica que sólo

The Food Health Regulations of Chile (2011) indicates that only up to 5 µg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and/or G₂ in foods are allowed and up to 0.05 µg/kg of M₁ in milk.

Integrated management strategies. In Mexico, programs involving integrated management for reducing aflatoxins and fungi that produce them, are scarce. In Tamaulipas state, some actions were taken to control aflatoxin contamination, since heavy pollution in the grain (about 90 %) and high levels of aflatoxins (concentrations between 63 and 167 µg/kg) (Moreno and Gil, 1991; Carvajal and Arroyo, 1997), occurred in the maize grown in the region during 1989 and 1990, which was associated with the presence of high temperatures and severe pest attack on the reproductive stage of the crop, as well as factors favoring the drastically increased contamination of grain in regional warehouses (high humidity and temperature).

As for the field, the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP) developed a technology package for maize cultivation in the northern region of Tamaulipas. The actions described there include early planting date, proper density, adequate irrigation (three auxiliary irrigations) and strict monitoring of pest insects favoring aflatoxigenic fungal infection in the corn cob (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes and Cantú, 2006; Cantú *et al.*, 2010). By 1991, the contaminated grain was reduced to 20 % as a result of the development and application of this technology package. Additionally, in 1992, INIFAP released the hybrid HV-1, a maize type with white semi-toothed grain which is tolerant to planting conditions in soils of second class (Reyes and Cantu, 2003; 2004). Meanwhile, Martínez *et al.*, (2003) reported that aflatoxins concentrations in more than 70 % of the maize grown or stored in Camargo, Gustavo Diaz Ordaz, Matamoros, Reynosa, Rio Bravo, San Fernando and Valle Hermoso in 1998, showed values higher than those accepted by national standards and other countries for grain commercialization (20-233 µg/kg).

Later on, in response to the problem of limited water available for irrigation, INIFAP's genetic improvement program oriented its research to the development of tolerance to high temperatures and drought maize. In 2003, the H-437 and H-439 trilinear hybrids were released, which, on average produced 3.7 ton per hectare (Reyes and Cantu, 2003, 2004). H-436 and H-437 hybrids had the lowest percentages of contamination by fungi of the genera *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. (Hernández *et al.*, 2007); meanwhile, in the yellow grain H-443A hybrid, 14 µg/kg of aflatoxins were detected while seven yellow grain hybrids widely grown in northern Tamaulipas showed from 36-218 µg/kg in the seed (Reyes *et al.*, 2009).

From eleven maize genotypes commonly grown in Mexico, Popcorn C-526, Garst 8366, AS910 and 30G40 were resistant to colonization by *A. flavus* and aflatoxins accumulation; while the hybrids 3002W, 30R39, Creole, C-922, HV313 and P3028W were susceptible. The highest concentrations corresponded to AFB₁ (26.1 mg/kg ± 14.7), while AFB₂, AFG₁ and AFG₂ showed only residual concentrations. The results demonstrate that there is

deben permitirse hasta 5 µg/kg de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y/o G₂ en alimentos y hasta 0.05 µg/kg de M₁ en leche.

Estrategias de manejo integrado. En la actualidad son escasos, particularmente en México, los programas que incluyan un manejo integral para la disminución de las aflatoxinas y de los hongos productores de las mismas. En el estado de Tamaulipas se tomaron medidas para el control de la contaminación por aflatoxinas a partir de las fuertes contaminaciones en el grano (alrededor del 90 %) y los altos niveles de aflatoxinas (concentraciones entre 63 y 167 µg/kg) (Moreno y Gil, 1991; Carvajal y Arroyo, 1997) ocurridas en el maíz cultivado en la región durante 1989 y 1990; lo que se asoció con la presencia de temperaturas altas y el ataque severo de plagas en la etapa reproductiva del cultivo, así como factores favorecedores del drástico incremento de la contaminación del grano en los almacenes regionales (alta humedad y temperatura).

En el caso del campo, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) desarrolló un paquete tecnológico para el cultivo del maíz en la región norte de Tamaulipas. Estas medidas incluyen la fecha de siembra temprana, la densidad adecuada de siembra, una adecuada irrigación (tres riegos de auxilio) y el monitoreo estricto de insectos plaga favorecedores de la infección por hongos aflatoxigénicos en la mazorca (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes y Cantú, 2006; Cantú-Almaguer *et al.*, 2010). Para 1991 el grano contaminado se redujo al 20 % como resultado del desarrollo y aplicación del paquete tecnológico. Adicionalmente, el INIFAP liberó en 1992 el híbrido HV-1, un maíz con grano blanco semidentado tolerante a condiciones de siembra en suelos de segunda clase (Reyes y Cantú, 2003; 2004). Por su parte, Martínez *et al.* (2003) reportaron que las concentraciones de aflatoxinas en más del 70 % de los maíces cultivados o almacenados en los municipios tamaulipecos de Camargo, Gustavo Díaz Ordaz, Matamoros, Reynosa, Río Bravo, San Fernando y Valle Hermoso en 1998 exhibieron valores mayores a los máximos aceptados por las normas nacionales y de otros países para la comercialización del grano, desde 20 hasta 233 µg/kg.

Posteriormente, y en respuesta al problema de la poca disponibilidad de agua para riego, el programa de mejoramiento genético del INIFAP orientó la investigación a la formulación de maíces tolerantes a las altas temperaturas y sequía. En 2003 se liberaron los híbridos trilineales H-437 y H-439, mismos que produjeron en promedio 3.7 toneladas por hectárea (Reyes y Cantú, 2003, 2004). Los híbridos H-436 y H-437 tuvieron los menores porcentajes de contaminación por hongos de los géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (Hernández *et al.*, 2007); por su parte, en el híbrido de grano amarillo H-443A se detectó 14 µg/kg de aflatoxinas mientras que siete híbridos de grano amarillo ampliamente sembrados en el norte de Tamaulipas presentaron de 36 a 218 µg/kg en la semilla (Reyes *et al.*, 2009).

De once genotipos de maíz comúnmente cultivados en México, Popcorn, C-526, Garst 8366, AS910 y 30G40 fueron resistentes a la colonización por *A. flavus* y la acumulación de aflatoxinas; mientras que fueron

differential response to infection and aflatoxins accumulation, and that it is necessary the development of resistant germplasm to this phytosanitary problem (De Luna-López *et al.*, 2013).

All mentioned above, provides a perspective on the severity of recurrent incidence of aflatoxigenic fungi in northern Tamaulipas and U.S. border since the late twentieth century. Also it emphasizes the fact that the relative success in controlling the fungus and their aflatoxins, has been due to the release of germplasm with individual or combined resistance to infection predisposing factors (pests, drought) and not directly. This point is important: it should be proposed the standardization of evaluation and selection techniques of promising germplasm that involve the development of genetic improvement programs focused on the evaluation, selection, crossover and release of germplasm resistant to the pathogen and its metabolites. Similarly, besides the improvement, attention should be paid to the mapping of resistance genes and generation of linkage maps to facilitate the selection of parents and hybridization programs (Cary *et al.*, 2011). In the same way, weather conditions in the field and warehouse also motivate changes in the strategies, as well as the emergence of new toxigenic strains in maize growing regions that affect the genetic structure of *Aspergillus* communities (Cotty and Jaime-García, 2007; Jaime-García and Cotty, 2010). This motivates the constant change of cropping pattern in the region, as urgent and radical action, to reduce the incidence of these fungi as well as constant research and definition of new strategies for integrated problem management (Jaime-García and Cotty, 2010).

Control measures in field and storage. *Aspergillus* or its toxins control in the maize plant has involved the use of chemicals for their eradication. However, this strategy is relatively expensive. Insects that could act as vectors to facilitate the entry of conidia into the corncob have generated resistance to insecticides. In addition to this, there are restrictions on the use of pesticides given the environmental regulations. In Mexico, some coleoptera in corn such as *Carpophilus fremani*, *Carthartus quadricollis* and *Sitophilus zaemais* have been identified; among them, *Sitophilus* is associated to 90 % of *A. flavus* infections in the field (García *et al.*, 2003). As for biological control, it has been shown that growth reduction, aflatoxin production or even modification of aflatoxins structures has been due to the action of some bacteria and fungi such as *A. niger*, *Rhodococcus corynebacterioides* (*Niocardia corynebacteroides*), *Candida parapsilosis*, *Myxococcus fulvus*, *Mucor ambiguus* and *Trichoderma viride*. However, most of these studies have been carried out under laboratory conditions (Suárez *et al.*, 2007; Tejada-Castañeda *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Aliabadi *et al.*, 2013; Devreese *et al.*, 2013). Bacteria of the *Bacillus* genus has shown anti-fungal activity against *A. flavus* (Moyné *et al.*, 2001; Taylor and Draughon, 2001). Palumbo *et al.* (2006) reported that *Bacillus* provides an effective antagonist to *A. flavus* growth in almonds. Meanwhile, Gao *et al.* (2011) found that a *B. subtilis* strain obtained from fish intestines was able to

susceptibles los híbridos 3002W, 30R39, Creole, C-922, HV313 y P3028W. Las concentraciones mayores correspondieron a AFB₁ (26.1 mg/kg ± 14.7), mientras que AFB₂, AFG₁ and AFG₂ presentaron concentraciones residuales. Los resultados indican que hay respuesta diferenciada a la infección y acumulación de aflatoxinas y hace necesario el desarrollo de germoplasma resistente a este problema fitosanitario (De Luna-López *et al.*, 2013).

Lo anterior ofrece una perspectiva de la recurrente gravedad de la incidencia de hongos aflatoxigénicos en la región norte de Tamaulipas y fronteriza con EUA desde fines del siglo XX. También, hace notar el hecho que los relativos éxitos en el control del hongo y de sus aflatoxinas no se han obtenido directamente sino que, indirectamente y a través de la liberación de germoplasma con resistencias individuales o combinadas a factores favorecedores de la infección (plagas, sequía) se logran reducciones significativas. Este punto es de importancia: debe proponerse la estandarización de técnicas de evaluación y selección de germoplasma promisorio que conlleve el desarrollo de programas de mejoramiento genético enfocados en la evaluación, selección, cruzamiento y liberación de germoplasma resistente al patógeno y sus metabolitos. De igual forma, debe ponerse atención, a la par del mejoramiento como tal, en el mapeo de genes de resistencia y generación de mapas de ligamiento que faciliten la selección de progenitores y los programas de hibridación (Cary *et al.*, 2011). De igual forma, las condiciones climáticas en campo y almacén también motivan cambios en las estrategias, así como la aparición de nuevas cepas toxigénicas en las regiones maiceras y que afectan la estructura genética de las comunidades de *Aspergillus* (Cotty y Jaime-García, 2007; Jaime-García y Cotty, 2010). Ello motiva a la constante modificación del patrón de cultivos en la región como medida urgente y radical para reducir la incidencia de dichos hongos así como la constante búsqueda y definición de nuevas estrategias de manejo integrado del problema (Jaime-García y Cotty, 2010).

Medidas de control en campo y almacén. El control de *Aspergillus* o sus toxinas en la planta de maíz ha consistido en la utilización de productos químicos para su erradicación. Sin embargo esta estrategia es relativamente costosa. Los insectos que podrían actuar como vectores al facilitar la entrada de conidios dentro de la mazorca han generado resistencia a los insecticidas. Aunado a lo anterior existen restricciones en el uso de plaguicidas dadas las regulaciones ambientales. En México se han identificado algunos coleópteros presentes en maíz como *Carpophilus fremani*, *Carthartus quadricollis* y *Sitophilus zeamais*; de ellos, *Sitophilus* se asocia con 90 % de las infecciones por *A. flavus* en campo (García *et al.*, 2003). En cuanto al control biológico se ha comprobado la reducción del crecimiento o de la producción de aflatoxinas o incluso la modificación de las estructuras de las aflatoxinas debido a la acción de bacterias y hongos tales como *A. niger*, *Rhodococcus corynebacterioides* (*Niocardia corynebacteroides*), *Candida parapsilosis*, *Myxococcus fulvus*, *Mucor ambiguus* y *Trichoderma viride*. No obstante, la mayoría de esos

detoxify toxins and degrade B₁, M₁ and G₁ aflatoxins in an 80, 60 and 80 %, respectively. Among the mechanisms used by such microorganisms to reduce *Aspergillus* growth or aflatoxins production are: competition for space and/or nutrients, antibiosis via synthesis of degrading enzymes, parasitism or the binding of aflatoxin molecules to the cell walls of the biocontrol microorganism based on their marked hydrophobicity (Niknejad *et al.*, 2012). This leads to consider this strategy as a promising alternative in the aflatoxins management.

The butylated hydroxyanisole (BHA), butyl hydroxy toluene (BHT) and propyl paraben (PP) compounds, control the growth and aflatoxin synthesis of *A. flavus* and *A. parasiticus* in stored grain (Thompson, 1992). Moreno and Vázquez (2000) evaluated the effectiveness of ammonium, calcium and sodium propionates in reducing the incidence of *A. flavus* and its aflatoxins in Tamaulipas corn. These three propionates reduced the incidence of aflatoxins below 20 µg/kg; however, fungistats phytotoxicity was observed in the corn germination, as germinating grain treated with four doses of ammonium propionate was close to zero. Other compounds reduce fungal growth and host contamination (Lira, 2003). Tequida *et al.* (2002) reported that 'gobernadora' (*L. tridentata*) methanolic and/or ethanolic alcoholic extracts inhibited *A. flavus* and *A. niger* growth in a 40 to 100 % range. Rocha-Vilela *et al.* (2009) found that the 1,8-cineole compound isolated from *Eucalyptus globulus* inhibited the growth and production of aflatoxin B₁ of *A. flavus* and *A. parasiticus*. Meanwhile, Moreno and González (2011) reported that 'gobernadora' alcoholic extracts (3-7 mg / mL) inhibited up to 100 % *A. flavus* growth. El-Nagerabi *et al.* (2013) evaluated leaf extracts, resins and essential oils from *Boswellia sacra* for *A. flavus* and *A. parasiticus* control; the resin and essential oil inhibited between 40 and 90 % the growth and aflatoxins secretion of both fungal genera. Plant extracts or other biocontrol agents usually contain substances that show a direct effect on the reduction or complete inhibition of *Aspergillus* growth via degradation of structural wall and membrane components and organelles (Nogueira *et al.*, 2010). For example, guaiaretic acid, linoleic acid, quinones, terpenes, coumarins, precocenes, glycosides, carnosic acid, etc., have been reported (Tequida *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2010; Moreno-González *et al.*, 2011). The results of these studies with plant extracts are promising considering that emphasis should be placed on the characterization and detection of compounds useful for the management of toxigenic fungi in maize grain.

Another method involves the use of silo bags made from polystyrene and UV filter. The most commonly used size is 60-75 m long and 2.7 m wide. Each bag can store 200 tons of grain. This method is economically affordable and it provides an efficient way to preserve the grain (Fornieles, 2001).

The management strategy that has proven effective in reducing aflatoxin contamination in pre and post-harvest maize, is the use of *A. flavus* atoxigenic breeds (non-toxin producers), which by competing for the same substrates for growth and development, displace populations of toxigenic

estudios se ha realizado en condiciones de laboratorio (Suárez *et al.*, 2007; Tejada-Castañeda *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Aliabadi *et al.*, 2013; Devreese *et al.*, 2013). Las bacterias del género *Bacillus* muestran actividad antifúngica contra *A. flavus* (Moyné *et al.*, 2001; Taylor y Draughon, 2001). Palumbo *et al.* (2006) informaron que *Bacillus* ofrece un efectivo antagonista al crecimiento de *A. flavus* en almendras. Por su parte, Gao *et al.* (2011) observaron que una cepa de *B. subtilis* obtenida de intestinos de peces fue capaz de detoxificar las toxinas y de degradar las aflatoxinas B₁, M₁ y G₁ en un 80, 60 y 80 %, respectivamente. Entre los mecanismos utilizados por los microorganismos antes señalados para reducir el crecimiento de *Aspergillus* o la producción de las aflatoxinas están la competencia por espacio y/o nutrientes, antibiosis vía la síntesis de enzimas degradadoras, parasitismo, o bien, la unión de las moléculas de la aflatoxina a las paredes celulares del microorganismo biocontrolador en virtud de su marcada hidrofobicidad (Niknejad *et al.*, 2012). Ello lleva a considerar esta estrategia como una alternativa promisoría en el manejo de aflatoxinas.

Los compuestos Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-Hidroxitolueno (BHT) y Propil-parabeno (PP) controlan el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Thompson, 1992) en granos almacenados. Moreno y Vázquez (2000) evaluaron la efectividad de los propionatos de amonio, de calcio y de sodio en la reducción de la incidencia de *A. flavus* y sus aflatoxinas en maíz de Tamaulipas. Los tres propionatos redujeron la incidencia de aflatoxinas por debajo de los 20 µg/kg; sin embargo, se observó fitototoxicidad de los fungistatos en la germinación del grano de maíz pues la germinación del grano tratado con las cuatro dosis del propionato de amonio fue cercana a cero. Otros compuestos reducen el crecimiento del hongo y la consiguiente contaminación del hospedante (Lira, 2003). Tequida *et al.* (2002) reportaron que extractos alcohólicos metanólicos y/o etanólicos de 'gobernadora' (*L. tridentata*) inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. niger* en un rango de 40 hasta 100 %. Rocha-Vilela *et al.* (2009) determinaron que el compuesto 1,8-cineol aislado de *Eucalyptus globulus* inhibió el crecimiento y la producción de aflatoxina B₁ de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Por su parte, Moreno y González (2011) indicaron que los extractos alcohólicos de 'gobernadora' (3 a 7 mg/mL de concentración) inhibieron hasta 100 % el crecimiento de *A. flavus*. El-Nagerabi *et al.* (2013) evaluaron extractos de hoja, resinas y aceites esenciales de *Boswellia sacra* para el control de *A. flavus* y *A. parasiticus*; la resina y el aceite esencial inhibieron, entre 40 y 90 %, el crecimiento y la secreción de aflatoxinas de ambos géneros fúngicos. Los extractos de plantas u otros agentes biocontroladores usualmente contienen sustancias que muestran un efecto directo en la reducción o total inhibición del crecimiento de *Aspergillus*, vía degradación de componentes estructurales de pared y membrana y organelos (Nogueira *et al.*, 2010). Por ejemplo, se reportan ácido guaiarético, ácido linoléico, quinonas, terpenos, cumarinas, precocenos, glicósidos,

fungi (Yin *et al.*, 2008; Degola *et al.*, 2011). This biological control is used in the southern United States (Arizona, California, Texas) in corn, cotton, peanut and pistachio crops, where aflatoxins incidence is reduced from 70-90 % (Pitt and Hocking, 2006; Dorner, 2008; Abbas *et al.*, 2011a). For effective competitive exclusion, nontoxigenic strains feasible to be used as biocontrol, must be prevalent in farm environments when crops are susceptible to infection by toxigenic strains. Some characteristics of such strains are their capacity for growth and sporulation, genetic stability, ability to adapt to unfavorable environments and control of aflatoxins, cyclopiazonic acid and fumonisins synthesis (Abbas *et al.*, 2011b). The strains that have shown better results in the field and under storage for *A. flavus* are AF36, NRRL21882 (Alfa Guard®), CT3 and K49 and NRRL21369 for *A. parasiticus*, among others that have promoted variable reductions in aflatoxins, cyclopiazonic acid and fumonisins synthesis in corn and other crops, ranging from 20 to 90 % compared to untreated plants (Abbas *et al.*, 2006; 2011a; 2011b). New biocontrol strategies, even in the field evaluation, consist of applying atoxigenic *A. flavus* strain mixed with bioplastic substrates. For example, the mixture of conidia of the atoxigenic strain with a bioplastic starch-based (Mater-Bi®) is being tested (Accinelli *et al.*, 2009; 2012); as well as the application of the strain to the corncob (more effective than when applied in the soil) mixed in water dispersible granules based on clay, also with promising control results (Abbas *et al.*, 2011b).

Measures to decontaminate the grain. The ideal decontamination process should be cheap, simple and without producing toxic secondary compounds or that alter the nutritional characteristics and palatability during or after use (Elias *et al.*, 2002). In Mexico, physical methods have mainly been used such as nixtamalization, extrusion and removal by adsorbents. According to Guzmán *et al.*, (1995) and Anguiano *et al.* (2005), nixtamalization process destroys up to 95-100 % of aflatoxins in maize. In this sense, also Pérez-Flores *et al.* (2011) reported that a modified process for making tortillas based on microwaves reduced between 68 and 84 % the incidence of B₁ and B₂ aflatoxins; Torres *et al.* (2001) found reductions of 52, 85 and 79 % of aflatoxins in tortillas, chips and fries, respectively. While nixtamalization reduced levels of AFB₁, AFM1 and AFB1 8-9 dihydrodiol at 94, 90 and 93 % respectively, in samples with high levels of contamination, the extrusion of corn grain with water containing 0.3 % lime and 1.5 % hydrogen peroxide, reduced 100 % their levels; besides, lime and hydrogen peroxide did not affect tortillas aroma and flavor. Various modifications of nixtamalization and extrusion and their combination, were evaluated based on their effects on the removal of contaminants and the tortillas quality, although some are costly or require more energy. Most of these processes have not been commercially used to decontaminate maize, although their study could have applications and promising results in the short term (Personal Communication. Juan De Dios Figueroa-Cardenas, PhD. CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro. Querétaro, México. 2012). Similarly, the use of natural

ácido carnósico, etc. (Tequida *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2010; Moreno y González *et al.*, 2011). Los resultados de estos trabajos con extractos de plantas son promisorios en virtud de que debe ponerse énfasis en la caracterización y detección de compuestos con utilidad para el manejo de hongos toxígenos del grano de maíz.

Otro método consiste en el uso de bolsas de silo fabricadas con poliestireno y filtro de rayos ultravioleta. El tamaño más utilizado es de 60-75 m de largo y 2.7 m de ancho. Cada bolsa puede almacenar unas 200 ton de grano. Dicho método es económicamente costeable ya que proporciona una forma eficiente de preservar el grano (Fornieles, 2001).

La estrategia de manejo que ha mostrado ser efectiva en la reducción de la contaminación de aflatoxinas en pre y post cosecha del maíz consiste en el uso de razas atoxigénicas (que no producen toxinas) de *A. flavus*, mismas que por competencia por los mismos sustratos para el crecimiento y desarrollo desplazan a las poblaciones de hongos toxigénicos (Yin *et al.*, 2008; Degola *et al.*, 2011). Esta medida de control biológico se utiliza en el sur de Estados Unidos (Arizona, California, Texas) en cultivos como maíz, algodón, cacahuate y pistache, donde la incidencia de aflatoxinas se reduce del 70 hasta 90 % (Pitt y Hocking, 2006; Dorner, 2008; Abbas *et al.*, 2011a). Para que la exclusión competitiva sea eficaz, las cepas no toxigénicas factibles para aplicarse a manera de biocontrol deben ser predominantes en los entornos agrícolas cuando los cultivos son susceptibles de ser infectados por las cepas toxigénicas. Algunas características de dichas cepas son su capacidad de crecimiento y esporulación, su estabilidad genética, capacidad para adaptarse a ambientes desfavorables y control de la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas (Abbas *et al.*, 2011b). Las cepas que mejores resultados han mostrado en campo y almacén son AF36, NRRL21882 (Alfa Guard®), CT3 y K49 de *A. flavus* y NRRL21369 de *A. parasiticus*, entre otras mismas que han promovido reducciones variables en la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas en maíz y otros cultivos, que van desde un 20 a un 90 % en comparación con plantas no tratadas (Abbas *et al.*, 2006; 2011a; 2011b). Nuevas estrategias de biocontrol, aún en evaluación en campo, consisten en aplicar la cepa atoxigénica de *A. flavus* mezclada con sustratos bioplásticos. Por ejemplo, se está probando la mezcla de los conidios de la cepa atoxigénica con un bioplástico basado en almidón (Mater-Bi®) (Accinelli *et al.*, 2009; 2012); así como la aplicación de la cepa a la mazorca (más eficaz que al aplicarse en el suelo) mezclada en gránulos dispersables en agua basados en arcilla, igualmente con resultados de control promisorios (Abbas *et al.*, 2011b).

Medidas para descontaminar el grano. El proceso de descontaminación ideal debe ser barato, sencillo y que no produzca compuestos secundarios tóxicos o que altere las características nutrimentales y de palatabilidad durante o después de su utilización (Elias *et al.*, 2002). En México se han utilizado principalmente métodos físicos como la nixtamalización, extrusión y eliminación por adsorbentes. De acuerdo con Guzmán *et al.* (1995) y Anguiano *et al.*

decontaminating or synthetic substances known as 'sequestering' (clays, zeolites, bentonites, activated carbon, aluminosilicates, polymers and products of the yeast cell wall) may counteract aflatoxins toxicity (Ramos and Hernández, 1997; Boudergue *et al.*, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2010); unlike Mexico, these strategies have been evaluated experimentally in cattle in Europe (Devreese *et al.*, 2013).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

Maize is the most important food in Mexico, so it is necessary to optimize its production and conservation safely. The attack of various pathogens in the field and during storage cause damage to the production; however, there are not direct and effective measures to reduce or annul infections caused by toxigenic fungi of the corncob, but only preventive measures that weaken the infection or production of such toxins. One such measure is the change in planting dates so that the most sensitive phase of the corn life cycle, the reproductive one, does not coincide with favorable environmental conditions, environmental stress, infection or high incidence of aflatoxigenic fungi. This measure is applied in conjunction with the use of hybrids with tolerance to stress factors, such as high temperatures and drought stress (Reyes and Cantú, 2006). The high incidence of toxigenic fungi in corn, and the incidence of their contaminant mycotoxins are of particular concern in corn produced in regions, such as northeastern Mexico and in Europe, America and Africa. This is vital if production is mostly intended for human consumption as in Africa and Latin America.

Agronomic impacts experienced by the United States due to the loss of grains in the field and in storage, showed the need to generate effective proposals to minimize the aflatoxigenic fungi incidence. Efforts have been directed towards the development or adaptation of cultural practices such as tillage, fertilization, planting density, irrigation, pest control and planting dates, genetic improvement and mapping of resistance genes (Cary *et al.*, 2011; Devreese *et al.*, 2013; Magnussen and Parsi, 2013), among others. In Mexico, something similar occurred, particularly in maize growing areas of the northern part of the country, where some studies generated technological packages, particularly by INIFAP, that tried to minimize aflatoxin contamination on the corncob, tolerance to environmental stress and maximizing the yield potential of the maize grain (Reyes y Cantú, 2006), but despite all the efforts, the effects caused by the aflatoxigenic fungi are recurrent and sometimes significant.

For all the reasons mentioned above, some research areas should be followed in the medium and long term, with at least, strong emphasis on maize growing regions of Mexico where *Aspergillus* and its aflatoxins are important. Diagnosis and timely assessment of damage by fungi and pests must continue, as well as the identification of associations, response measurements and generation of technological packages that gradually allow to reduce or completely inhibit the aflatoxigenic fungi, aflatoxin contamination and a maize production of high health and

(2005), el proceso de nixtamalización destruye del 95 al 100 % de las aflatoxinas del maíz. En este sentido, también Pérez-Flores *et al.* (2011) reportaron que un método modificado para fabricar tortillas basado en el uso de microondas redujo entre 68 y 84 % la incidencia de aflatoxinas B₁ y B₂; Torres *et al.* (2001) encontraron reducciones de 52, 85 y 79 % de aflatoxinas en tortillas, totopos y frituras, respectivamente. Mientras que la nixtamalización redujo los niveles de AFB₁, AFM₁, y AFB₁ 8-9 dihidrodiole en 94, 90 y 93 % respectivamente en muestras con altos niveles de contaminación, la extrusión del grano de maíz con agua conteniendo 0.3 % de cal y 1.5 % de peróxido de hidrógeno redujo al 100 %; además, la cal y el peróxido de hidrógeno no afectaron el aroma y el sabor de las tortillas. Diversas modificaciones de la nixtamalización, la extrusión y la combinación de ambas se han evaluado con base en sus efectos en la eliminación de contaminantes y la calidad de la tortilla, aunque algunos resultan costosos o requieren más energía. La mayoría de estos procesos no se han utilizado comercialmente para descontaminar maíz, aunque su estudio podría tener aplicaciones y resultados promisorios en el corto plazo (Comunicación Personal. Dr. Juan De Dios Figueroa-Cárdenas. CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro. Querétaro, México. 2012). Así mismo, el uso de sustancias descontaminantes naturales o sintéticas denominadas 'secuestrantes' (arcillas, zeolitas, bentonitas, carbón activado, aluminosilicatos, polímeros y productos de la pared celular de levaduras) pueden contrarrestar la toxicidad de las aflatoxinas (Ramos y Hernández, 1997; Boudergue *et al.*, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2010); a diferencia de México, éstas estrategias se han evaluado experimentalmente en ganado en Europa (Devreese *et al.*, 2013).

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El maíz es el alimento más importante en la República Mexicana, por lo que es necesario optimizar su producción y conservación de manera inocua. El ataque de diversos patógenos en el campo y el almacén causan daños a la producción; no obstante, no se utilizan de manera generalizada medidas de control directas y efectivas para reducir o anular la infección por hongos toxígenos de la mazorca, salvo medidas preventivas que desfavorecen la infección o la producción de dichas toxinas. Una de estas medidas consiste en la modificación de las fechas de siembra de modo que la fase sensible del ciclo biológico del maíz, la reproductiva, no coincida con las condiciones ambientales favorables o al estrés ambiental o a la alta incidencia e infección de hongos aflatoxigénicos. Esta medida se aplica en conjunto con el uso de híbridos con tolerancia a factores de estrés, como las altas temperaturas y el déficit hídrico (Reyes y Cantú, 2006). La alta incidencia de hongos toxígenos en maíz y la ocurrencia de sus micotoxinas contaminantes son particularmente preocupantes en el maíz producido en regiones como el noreste de México, así como a nivel mundial en Europa, América y África. Esto es de vital importancia si la producción se destina mayormente al consumo humano como ocurre en África y América Latina.

nutritional values, and especially in those production regions with recurrent aflatoxigenic fungi damage. One very important area of research consists on the systematic evaluation of non-toxicogenic strains in maize germplasm of white or yellow grain adapted to each agro-ecological region, so that their efficiency is validated in the control of fungi and aflatoxins in Mexico, particularly in the medium and long term in the context of global climate change and with the combination of multidisciplinary research groups (agronomists, molecular biologists, breeders, plant pathologists, meteorologists, etc.) (Paterson and Lima, 2010; 2011). Another research area could be the development of basic and applied *Aspergillus* research and its aflatoxins in Mexico, because the studies at genetic-molecular level are limited in Mexican strains of the fungus and its aflatoxins, as well as the integrative study of the pathosystem maize-*Aspergillus*-aflatoxins. Little is known of analyses at genetic level, genetic structure of populations, morphotypes distribution, morphotypes-genotype maize interactions, etc. Consistent studies on functional genomics of the pathosystem components and their interactions have not been done, especially those under specific environmental conditions such as drought stress and/or high temperatures, which are grouped into the mechanism known as 'quorum-sensing' and 'Velvet complex' identified in *A. flavus* and its implications in the routes of the secondary metabolism (Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna and Payne, 2009; Amaike and Keller, 2011; Amare and Keller, 2014).

It is also necessary to maintain the pre-harvest care to avoid contamination by fungi. In the field, to provide good levels of moisture and prevent water stress, and in the soil, good fertility or supplemented with the recommended levels of nutrients for the crop. Once the harvest has been verified, care should be taken that the humidity in the storage room is low and provide ventilation to prevent the formation of 'hot spots' in warehouses or silos (Bucio *et al.*, 2001; Magan and Aldred, 2007). Another option is the use of substances such as organic acids which inhibit fungi growth or enzymes that selectively degrade aflatoxins (Magan and Aldred, 2007).

A new alternative is based on the experimental release and pilot planting of germoplasm of transgenic corn or genetically modified corn with individual resistors, or 'stacked', against herbicides (glyphosate, glufosinate ammonium), lepidopteran pests, roots and stems pests that, at least in northern Tamaulipas, show resistance to lepidopteran pests of the corncob and lower fungal infection levels potentially toxicogenic in the corncob (SENASICA, 2014). However, the research is still ongoing and without conclusive results, but previous reports of Reddy *et al.* (2007) concluded that the use of maize germplasm with resistance to glyphosate and that allows weed control with such herbicide, showed increments in the *A. flavus* incidence in the herbicide-treated soil, although no increments in the presence aflatoxin and fumonisin in the grain. Apparently, glyphosate joins soil colloidal matrix leaving smaller proportion of bioavailable material to interfere with the growth of aflatoxigenic fungi, or even with non aflatoxigenic strains used as biocontrol (Accinelli *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

Los impactos agronómicos que han experimentado los Estados Unidos de América debido a la pérdida de granos en campo y almacén evidenció la necesidad de generar propuestas efectivas para minimizar la incidencia de hongos aflatoxigénicos. Los esfuerzos se han dirigido al desarrollo o adecuación de las prácticas de cultivo como la labranza, fertilización, densidad de siembra, irrigación, control de insectos y fechas de siembra, mejoramiento genético y mapeo de genes de resistencia (Cary *et al.*, 2011; Devreese *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013), entre otras. En México sucedió algo similar, particularmente en las zonas maiceras del norte del país, se desarrollaron estudios que generaron paquetes tecnológicos, particularmente por el INIFAP, que trataron de minimizar la contaminación por aflatoxinas en la mazorca, la tolerancia al estrés ambiental y maximizando el potencial de rendimiento de grano del cultivo (Reyes y Cantú, 2006). A pesar de esto, las afectaciones por los hongos aflatoxigénicos son recurrentes y, en ocasiones, significativas.

Lo anterior propone algunas líneas de investigación que deberían seguirse en el mediano y largo plazos al menos con marcado énfasis en las regiones maiceras de México donde *Aspergillus* y sus aflatoxinas son importantes. Debe continuarse el diagnóstico y la evaluación oportuna de los daños por hongos y plagas, identificar asociaciones, medir respuestas y generar paquetes tecnológicos que permitan paulatinamente reducir o inhibir por completo a los hongos aflatoxigénicos, la contaminación por aflatoxinas y una producción de maíz con alta calidad sanitaria, nutrimental y rentable en aquellas regiones productoras que presentan daños recurrentes por hongos aflatoxigénicos. Un nicho de oportunidad, consiste en la evaluación consistente y sistemática de cepas no toxígenas en el germoplasma de maíz con grano blanco o amarillo, adaptado a cada región agroecológica, de modo que se valide su pertinencia en el control de los hongos y sus aflatoxinas en México, particularmente en el mediano y largo plazo en el contexto del cambio climático global y con la integración de grupos de investigación multidisciplinarios (agronomos, biólogos moleculares, mejoradores, fitopatólogos, meteorólogos, etc.) (Paterson y Lima, 2010; 2011). Otro nicho de oportunidad se basa en el desarrollo de investigación básica y aplicada de *Aspergillus* y sus aflatoxinas en México, pues es escaso el estudio a nivel genético-molecular en cepas Mexicanas del hongo y de sus aflatoxinas, así como del estudio integrativo del patosistema maíz-*Aspergillus*-aflatoxinas. Poco se sabe del análisis a nivel genético, de estructura genética de poblaciones, distribución de morfotipos, interacciones morfotipos-genotipos de maíz, etc. Tampoco se conducen estudios consistentes relativos a la genómica funcional de los componentes del patosistema ni de su interacción, bajo condiciones ambientales particulares como estrés por sequía y/o altas temperaturas, lo que se agrupa en el mecanismo denominado 'quorum-sensing' y el 'complejo Velvet' identificados en *A. flavus* y sus implicaciones en las rutas del metabolismo secundario (Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Amaike y Keller, 2011; Amare y Keller, 2014).

Es necesario, además, mantener los cuidados previos

CONCLUSIONS

Currently in Mexico, the status of *Aspergillus* and its mycotoxins studies in maize, has shown significant progress, so that high incidences and damage observed in past decades have been significantly reduced. However, the problem persists because the factors favoring the occurrence of toxigenic fungi in the field and warehouse can suddenly occur, causing huge losses in the agricultural sector. Therefore, it is imperative to continue with the diagnosis and analysis of the incidence and damage caused by aflatoxins in Mexican maize. It is therefore necessary to establish prevention programs that include the following: 1) the dissemination of economic and health problems caused by aflatoxins contamination, 2) the use of the Hazard Analysis Critical Control Point Systems, HACCPs), 3) to develop and consolidate the efficiency of new chemical, cultural and/or biological strategies for the incidence of aflatoxigenic fungi and its aflatoxins; 4) to maintain the genetic improvement of maize for resistance to insect pests, environmental stress factors such as drought and high temperatures, and lay the foundation for consistent genetic improvement focused in genetic characterization and progenitor identification, selection, crossbreeding and mapping of resistance genes to infection by aflatoxigenic fungi or inhibitors of the synthesis of aflatoxins, and 5) to establish and maintain programs for epidemiological health and diagnosis in both humans and animals, together with the establishment of official norms and specific diagnostic and quantification methods that are cheap, reproducible, rapid, sensitive and reliable for aflatoxins in Mexican corn.

Acknowledgements. The first author acknowledges funding provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 421712) and to the PIFI program (grant number B110668) of the Instituto Politécnico Nacional by funding her graduate studies at the CBG-IPN. Publication costs of this work are funded by the Tamaulipas PRODUCE Foundation (projects 2009-1750 and 2012-2112) and the Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURA CITADA

- Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, and Abel CA. 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology* 16:437-449.
- Abbas HK, Zablotowicz RM, Horn BW, Phillips NA, Johnson BJ, Jin X, and Abel CA. 2011a. Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives and Contaminants* 28:198-208.
- Abbas HK, Weaver MA, Horn BW, Carbone I, Monacell JT, and Shier WT. 2011b. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews* 30:59-70.
- Accinelli C, Koskinen WC, Seebinger JD, Vicari A, and Sadowsky MJ. 2005. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

a la cosecha para evitar la contaminación por hongos. En campo, proveer buenos niveles de humedad y evitar el estrés hídrico, así como suelos con buena fertilidad o suplementado con los niveles de nutrimentos recomendados para el cultivo. Una vez verificada la cosecha, debe procurarse que las condiciones de humedad en el almacén sean bajas, proporcionar aireación para evitar la formación de 'puntos calientes' en los almacenes o silos (Bucio *et al.*, 2001; Magan y Aldred, 2007). Otra opción es el uso de sustancias como los ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de los hongos o bien, enzimas que degradan selectivamente las aflatoxinas (Magan y Aldred, 2007).

Una nueva alternativa se basa en la liberación experimental y en siembra piloto de germoplasma de maíz transgénico o genéticamente modificado con resistencias individuales o 'apiladas' a herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio), plagas de lepidópteros, plagas de raíces y tallos que, al menos en el norte de Tamaulipas, muestran resistencia a plagas de lepidópteros de la mazorca y menores niveles de infección por hongos potencialmente tóxicos en la mazorca (SENASICA, 2014). Sin embargo, la investigación está en proceso y aún no se tienen resultados concluyentes y, adicionalmente, están los resultados previos de Reddy *et al.* (2007) quienes concluyeron que el uso de germoplasma de maíz con resistencia a glifosato y que permite el control de malezas con dicho herbicida, mostró incrementos en la incidencia de *A. flavus* en el suelo tratado con el herbicida, aunque no incrementos en la presencia de aflatoxinas y fumonisinas en el grano. Aparentemente, el glifosato se une a la matriz coloidal del suelo dejando menor proporción de material biodisponible para interferir con el crecimiento del hongo aflatoxigénico o, incluso, con cepas no aflatoxigénicas usadas como biocontrol (Accinelli *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El estado actual del estudio de *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz ha mostrado avances importantes en fechas recientes en México, de modo que las altas incidencias y daños observados en décadas pasadas se han reducido significativamente. Sin embargo, el problema persiste debido a que se pueden presentar los factores que propician la incidencia de hongos toxigénicos en campo y almacén, generando pérdidas millonarias en el sector agrícola. Por ello, es imperativo continuar con el diagnóstico y análisis de la incidencia y daños por aflatoxinas en el cultivo del maíz en México. Por ello se considera necesario establecer programas de prevención que incluyan los siguientes puntos: 1) divulgación de los problemas económicos y de salud causados por la contaminación con aflatoxinas, 2) utilización de programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de los Sistemas de Control ('Hazard Analysis Critical Control Point Systems', HACCPs), 3) desarrollar y consolidar la evaluación de las nuevas estrategias de tipo químico, cultural y/o biológico de la incidencia de hongos aflatoxigénicos y sus aflatoxinas; 4) mantener el mejoramiento genético del maíz por resistencia a plagas de insectos, factores de estrés ambiental como sequía y altas temperaturas y sentar las bases para el

- 53:4110-4117.
- Accinelli C, Saccà ML, Abbas HK, Zablutowickz RM, and Wilkinson JR. 2009. Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bioresource Technology* 100:3997-4004.
- Accinelli C, Mencarelli M, Saccà ML, Vicari A, and Abbas HK. 2012. Managing and monitoring of *Aspergillus flavus* in corn using bioplastic-based formulations. *Crop Protection* 32:30-35.
- Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, and Cerutti P. 1994. Geographic variation of p53 mutational profile in non-malignant human liver. *Science* 264:1317-1319.
- Aliabadi MA, Alikhani FE, Mohammadi M, and Darsanaki RK. 2013. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology* 3:162-166.
- Alvarado CM, Díaz FA, Delgado AE, and Montes GN. 2010. Impact of corn agronomic management on aflatoxin (*Aspergillus flavus*) contamination and charcoal stalk rot (*Macrophomina phaseolina*) incidence. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:575-582. 32 p.
- Amaike S and Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 49:107-133.
- Amare MG and Keller NP. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>
- Anguiano RGL, Verver A, Vargas C y Guzmán-De Peña D. 2005. Inactivación de aflatoxina B₁ y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública de México* 47:369-375.
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2012. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p.
- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot MC, Fremy JM, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, and Avantaggiato G. 2009. Review of mycotoxin - detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *Scientific Report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/1*. European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italy. 192 p.
- Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, and Cleveland TE. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162:155-166.
- Bucio VCM, Guzmán ODA, and Peña CJJ. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:83-87.
- Cantú-Almaguer MA, Reyes-Méndez CA y Rodríguez del Bosque LA. 2010. La Fecha de Siembra: Una alternativa para Incrementar la Producción de Maíz. Folleto Técnico no. 44. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP-SAGARPA. Río Bravo, México. 40 p.
- Carvajal M. 2013. Transformación de la aflatoxina B₁ de

mejoramiento genético consistente enfocado a la caracterización genética e identificación de progenitores, su cruce y selección y mapeo de genes de resistencia a la infección por hongos aflatoxigénicos o inhibitorios de la síntesis de aflatoxinas y 5) establecer y mantener programas de salud epidemiológica y de diagnóstico tanto en humanos como en animales, conjuntamente con la creación de normas oficiales y métodos de diagnóstico y cuantificación específicos baratos, reproducibles, rápidos, sensibles y confiables para las aflatoxinas en el maíz producido en México.

Agradecimientos. La primera autora agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca número 421712) y del programa PIFI beca número B110668 del Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de sus estudios de posgrado en el CBG-IPN. Los costos de publicación de este trabajo son financiados por la Fundación PRODUCE Tamaulipas (proyectos 2009-1750 y 2012-2112) y el Instituto Politécnico Nacional.

- alimentos, en el cancerígeno humano aducto AFB₁-ADN. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas UNAM 16:109-120.
- Carvajal M y Arroyo G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 22:327-350.
- Carvajal M, Berumen J, and Guardado EM. 2012. The presence of aflatoxin B₁-FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29:258-268.
- Cary JW, Rajasekaran K, Brown RL, Luo M, Chen ZY, and Bhatnagar D. 2011. Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxin* 3:678-696.
- Chang PK. 2003. The *Aspergillus parasiticus* protein *afII* interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator *afIR*. *Molecular and General Genetics* 268:711-719.
- Chang PK and Ehrlich KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology* 138:189-199.
- Chang PK, Horn BW, and Dorner JW. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology* 42:914-923.
- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, and Bennett JW. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 27:151-157.
- Cotty JW. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79:808-814.
- Cotty PJ and Jaime-García R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119:107-115.
- Coursaget N, Depril M, Chabaud R, Nandi V, Mayelo P, and LeCann B. 1993. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas. *British Journal of Cancer* 67:1395-1397.
- Criseo G, Racco C, and Romeo O. 2008. High genetic variability in non-aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex. *International Journal of Food Microbiology* 125:341-343.
- De Luna-López MC, Valdivia-Flores AG, Jaramillo-Juárez F, Reyes JL, Ortiz-Martínez R, and Quezada-Tristán T. 2013. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering* 3:688-698.
- Degola F, Berni E, and Restivo FM. 2011. Laboratory test for assessing efficacy of atoxigenic *Aspergillus flavus* strains as biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology* 146:235-243.
- Devreese M, de Backer P, and Croubels S. 2013. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82:181-190.
- Díaz-Franco A y Montes-García N. 2008. La fitopatología en la región semiárida de Tamaulipas, México: Reseña histórica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 62-70.
- Dorner JW. 2008 Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives & Contaminants* 25:203-208.
- Ehrlich KC and Cotty PJ. 2004. An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 65:473-478.
- Ehrlich KC, Yu J, and Cotty PJ. 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology* 99:518-527.
- Elias OR, Castellanos NA, Gaytan MM, Figueroa CJD, and Loarca PG. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion process for reduction in aflatoxin content. *Food Additives & Contaminants* 19:878-885.
- El-Nagerabi SAF, Elshafie AE, Alkhanjari SS, Al-Bahry S, and Elamin MR. 2013. Biological activities of *Boswellia sacra* extracts on the growth and aflatoxins secretion of two aflatoxigenic species of *Aspergillus* species. *Food Control* 34:763-769.
- FDA (Food and Drugs Administration). 2012. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm (consulta, mayo 2012).
- Fornieles J. 2001. Almacenaje de granos en silos bolsa. Una alternativa, INTA. www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/granos/Fornieles.pdf (consulta, mayo 2012).
- García AG, Martínez FR y Melgarejo HJ. 2003 Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Sonora durante el año 1998. Informe Técnico. Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, Universidad Nacional Autónoma de México 72:187-193.

- García S and Heredia N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* 162:255-264.
- Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y, and Ji C. 2011. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *European Food Research Technology* 232:957-962.
- Georgianna DR and Payne GA. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46:113-125.
- Georgianna DR, Fedorova ND, Burrohugs JL, Dolezal AL, Bok JW, Horowitz-Brown S, Woloshuk CP, Yu J, Keller NP, and Payne GA. 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology* 11: 213-226.
- Guzmán-De Peña D. 2007. La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México* 49:227-235.
- Guzmán ODA, Trudel L, and Wogan GN. 1995. Corn "nixtamalización" and the fate of radiolabelled aflatoxin B₁ in the tortilla making process. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55:85-864.
- Hernández DS, Reyes LA, Reyes MCA, García OJG y Mayek PN. 2007. Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.
- Hong LS and Yusof NIM. 2010. Determination of aflatoxins B₁ and B₂ in peanut and corn based products. *Sains Malaysiana* 39:731-735.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 2013. <http://www.iarc.fr/index.php> (consulta, febrero 2013).
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, and Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycological Research* 105:233-239.
- Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, and Kensler TW. 2003. Prospective detection of codon 249 mutation in p53 in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 10:1657-1663.
- Jaime-García R and Cotty PJ. 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1842-1847.
- Kebede H, Abbas HK, Fisher DK and Bellaloui N. 2012. Relationship between aflatoxin contamination and physiological responses of corn plants under drought and heat stress. *Toxins* 4:1385-1403.
- Klich MA. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166p.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Li P, Zhang Q, Zhang D, Guan DX, Liu DX, Fang S, Wang X, and Zhang W. 2011. Aflatoxin measurement and analysis. pp. 183-208. *In: Torres-Pacheco I (ed.). Aflatoxins - Detection, Measurement, and Control. Intech. Rijeka, Croatia. 364 p.*
- Lira SRH. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D. C.), Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:214-221.
- Liu Y and Wu F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118:818-824.
- Madrigal BE, Madrigal SO, Alvarez GI, and Morales GJA. 2011. Aflatoxin B₁ - Prevention of Its Genetic Damage by Means of Chemical Agents. Pp: 251-282. *In: Torres PI. (ed.). Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. InTech Europe. 364 p.*
- Magan N and Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119:131-139.
- Magnussen A and Parsi MA. 2013. Aflatoxin, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology* 19:1508-1512.
- Martínez FR, García AG y Melgarejo HJ. 2003. Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en Tamaulipas, México, en 1998. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 74:313-321.
- Marui J, Yamane N, Ohashi-Kunihiro S, Ando T, Terabayashi Y, Sano M, Ohashi S, Ohshima E, Tachibana K, Higa Y, Nishimura M, Koike H, and Machida M. 2011. Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)(2)Cis(6) transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 112:40-43.
- Mejía TL, Chapa OAM, Vazquez CMA, Torres PI, and Guevara GRG. 2011. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology - Biotechnological Approaches for Control in Crops. Pp: 317-354. *In: Torres PI. (ed.). Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. InTech Europe. 364 p.*
- Méndez AJA, Arámbula VG, Preciado ORE, and Moreno MM. 2004. Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology* 94:211-215.
- Montes GN, Reyes MCA, Montes RN, and Cantú AMA. 2009. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *Journal of Food* 7:119-125.
- Moreno LS y González SL. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205.
- Moreno ME y Gil GM. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Coordinación de la investigación científica. Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 42p.
- Moreno ME y Vázquez BM. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia* 34:477-484.
- Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, and Singh J. 2013. A review

- of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 32:165-175.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, and Tuzun S. 2001. Bacillo-mycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90:622-629.
- Nazari ZK, Nakisa A, and Rahbar NF. 2013. The occurrence of aflatoxins in peanuts in supermarkets in Ahvaz, Iran. *Journal of Food Research* 2:94-100.
- Niknejad F, Zaini F, Faramarzi MA, Amini M, Kordbacheh P, Mahmoudi M, and Safara M. 2012. *Candida parapsilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal of Public Health* 41:72-80.
- Nogueira JHC, Gonzalez E, Galleti SR, Facanali R, Marques MOM, and Felicio JD. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137:55-60.
- Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, productos y servicios. Cereales y sus productos. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias ynutrimientales. d o f . g o b . m x / n o t a _ d e t a l l e . php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009 (consulta, mayo 2012).
- Novas MV and Cabral D. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 86:215-219.
- Ochoa MA, Torres CP, Moreno IG, Yépez GS, Álvarez CR, Marroquín JA, Tequida MM, and Silveira GM. 1989. Incidencia de Aflatoxina B₁ y Zearalenona en trigo y maíz almacenado en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Alimentarias* 1:16-20.
- Ortega PR. 2003. La diversidad del maíz en México. Pp:123-154. In: Esteva G y C Marielle (eds.). Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas México, D. F.
- Palumbo JD, Baker JL, and Mahoney NE. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial Ecology* 52:45-52.
- Paterson RRM and Lima M. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International* 43:1902-1914.
- Paterson RRM and Lima M. 2011. Further mycotoxins effects from climate change. *Food Research International* 44:2555-2566.
- Payne GA and Yu J. 2010. Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Machida M, Gomi K (eds.). pp. 157-171. Caister Academic Press. Norwich, United Kingdom. 238 p.
- Pérez-Flores GC, Moreno-Martínez E, and Méndez-Albore A. 2011. Effect of microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin contaminated maize. *Journal of Food Science* 76:T48-T52.
- Peterson SW, Horn BW, Ito Y, and Goto T. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. pp. 447-458. In: Samson RA y Pitt JI. (eds.). *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Pitt JI and Hocking AD. 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* 162:233-243.
- Plasencia J. 2004. Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *Journal of Toxicology* 23:155-177.
- Probst C, Schulthess F, and Cotty PJ. 2010. Impact of *Aspergillus* section Flavi community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology* 108:600-610.
- Probst C, Callicott KA, and Cotty PJ. 2012. Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers. *European Journal of Plant Pathology* 132:419-429.
- Ramos A y Hernández E. 1997. Adsorción *in vitro* de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: montmorillonita. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:7277.
- Reddy KN, Abbas HK, Zablutowickz RM, Abel CA, and Koger CH. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives and Contaminants* 24:1367-1373.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. 2012. Artículo 169, decreto 977/96 del Ministerio de Salud de Chile. www.sernac.cl/sernac2011/descargas/leyes/decreto/ds_977-96_reglamento_alimentos.pdf (consulta, mayo 2012).
- Requena F, Saume E y León A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 23:393-410.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2003. H-439: Híbrido de maíz de grano blanco para el trópico y subtropico de México. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Boletín Informativo Volumen 3, Número 7. Río Bravo, México. 2p.*
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2004. H-437, Híbrido de maíz para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:289-290.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2006. Maíz. Pp. 55-74. En: LA Rodríguez del Bosque (ed.). *Campo Experimental Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas. Historia, Logros y Retos. Libro Técnico no. 1. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP-SAGARPA. Río Bravo, México. 325 p.*
- Reyes MCA, Cantú AM, Garza CM, Vázquez CG y Córdova OH. 2009. H-443A, Híbrido de maíz de grano amarillo para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:331-333.
- Reyes VW, Patricio MS, Isaías EVH, Nathal VMA, De Lucas PE y Rojo F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria en México* 47:223-230.
- Reyes-Velázquez WP, Isaías-Espinoza VH, Rojo F,

- Jiménez-Plascencia C, de Lucas-Palacios E, Hernández-Góborá J, and Ramírez-Álvarez A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 30:182-185.
- Robledo ML, Marín S y Ramos AJ. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología* 18:141-144.
- Rocha-Vilela G, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFGF, Silva SC, Piedade SMS, Calori-Domingues MA, and da Gloria EM. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45:108-111.
- Rodríguez BLA. 1996. Impact of agronomic factor on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern México. *Plant Disease* 80:988-993.
- Rodríguez BLA, Cantú AMA, and Reyes MCA. 2010. Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) damage on maize ears in Northeastern México. *Southwestern Entomologist* 35:157-164.
- Rodríguez BLA, Reyes MCA, Acosta NS, Girón CJR, Garza CI y Villanueva GR. 1995. Control de aflatoxinas en maíz en Tamaulipas. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Folleto Técnico No. 17. Río Bravo, México. 20p.
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, and Geisen R. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135:231-237.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2014. Consulta Pública de Solicitudes de OGM. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.senasica.gob.mx (consulta, enero, 2014)
- Sharma M and Márquez C. 2001. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology* 93:109-114.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Estadísticas de Producción para el Año Agrícola 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siap.gob.mx/index (consulta, enero, 2014).
- Soini Y, Chia SC, Bennet WP, Groopman JD, Wang JS, and De Benedetti VMG. 1996 An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from México. *Carcinogenesis* 17:1007-1012.
- Stojanovska-Dimzoska B, Hajrulani-Muslin Z, Dimitrieska-Stojkovic E, Uzunov R, and Sekulovski P. 2013. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products determined by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Natural Sciences Matica Srpska Novi Sad* 124:27-35.
- Suárez EFC, Vargas GMJ, López CC, and Moreno J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection* 26:26-53.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Nieto-López M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos y Cruz-Suárez LE, 2010. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Gamboa-Delgado J (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Monterrey, México. pp. 514-546.
- Taylor WJ and Draughon FA. 2001. *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 64: 1030-1034.
- Tejada-Castañeda ZI, Ávila-González E, Casaubón-Huguenin MT, Cervantes-Olivares RA, Vásquez-Peláez C, Hernández-Baumgarten EM, and Moreno-Martínez E. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science* 87:1569-1576.
- Tequida MM, Cortez RM, Rosas BEC, López SS y Corrales MC. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:84-88.
- Thompson DP. 1992. Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84:791-793.
- Torres EE, Acuña AK, Naccha TL, and Castellon SJP. 1995. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Food Additives and Contaminants* 12:383-386.
- Torres PI, Guzmán OM, and Ramírez WB. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2825-2829.
- Umemura M, Koike H, Nagano N, Ishii T, Kawano J, Yamane N, Kozono I, Horimoto K, Shin-ya K, Asai K, Yu J, Bennett JW, and Machida M. 2013. MIDDAS-M: motif independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data. *PlosONE* 8:e84028.
- Unión Europea EFSA. 2002. Directiva de la Comisión del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal no. 2002/32/EC eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:285:0033:0037:ES:PDF (consulta, mayo 2012).
- Wild CP and Gong YY. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31:71-82.

- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, and Kuca K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews* 41:1-7.
- Yin YN, Yan LY, Jiang JH, and Ma ZH. 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B* 9:787-792.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, and Bennett JW. 2009. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1253-1262.
- Zhao LH, Guan S, Gao X, Ma QG, Lei YP, Bai XM, and Ji C. 2010. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* 110:147-155.

Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control

Fundamental aspects of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, Pathogenicity and Control

Nazario Francisco Francisco, Gabriel Gallegos Morales, Yisa María Ochoa Fuentes, Francisco D. Hernández Castillo, Departamento de Parasitología; Adalberto Benavides Mendoza, Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. CP 25084, México; Francisco Castillo Reyes, Campo Experimental Saltillo, INIFAP, carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119. Num. 9515, Colonia Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila. 25315, México. Autor correspondencia: ggalmor@uaaan.mx

(Recibido: Diciembre 13, 2013 Aceptado: Febrero 12, 2014)

Francisco Francisco N, Gallegos Morales G, Ochoa Fuentes YM, Hernández Castillo FD, Benavides Mendoza A y Castillo Reyes F. 2013. Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 147-160.

Resumen. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Smith) es la bacteria que ocasiona el tizón común bacteriano del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) síntoma que se caracteriza por la aparición de manchas con aspecto de tizón con un halo amarillo en hojas, tallos, y frutos reduciendo así el rendimiento del cultivo. La taxonomía de este patógeno ha sido muy cambiante debido a su variabilidad genética. La semilla infectada es la forma más eficiente de dispersión de la enfermedad entre las áreas cultivadas, el éxito de la infección y la multiplicación bacteriana en el tejido hospedero frecuentemente depende de factores de virulencia y del sistema de secreción. Los métodos de manejo que se emplean para contrarrestar la enfermedad en campo no han sido efectivos, no obstante, la constante búsqueda de nuevos enfoques como el empleo de agentes de biocontrol e inductores de resistencia, abren nuevas expectativas para su control.

Palabras clave adicionales: Diagnóstico bacteriano, factores de virulencia, control biológico.

El género *Xanthomonas* comprende un grupo de bacterias fitopatógenas Gram negativas dentro de la clase III Gammaproteobacteria (Saddler y Bradbury, 2005). Sus especies son típicamente de forma de bacilo con un solo flagelo polar, son aerobios obligados y requieren una temperatura óptima para su crecimiento de 28 °C (Torres et

Abstract. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) (Smith) is the bacterium that causes common bacterial blight in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) characterized by irregular necrotic staining with yellow halo on leaves, stems, and fruits with crop yield reduction. The taxonomy of this pathogen has been changing due their genetic variability. Infected seeds are one of the most efficient forms of disease dispersal between cultivated areas, the infection and bacterial multiplication in the host tissue often depend on the virulence factors and their secretion system. Management methods that are used to counter the disease in the field have not been effective, however, the constant search for new approaches as the use of biocontrol agents and resistance inducers, open new prospects for control.

Additional keywords: Diagnosis of bacterial, virulence factors, biological control.

Xanthomonas genus comprises a group of Gram-negative pathogenic bacteria within the Gammaproteobacteria class III (Saddler and Bradbury, 2005). Its species are typically rod-shaped with a single polar flagellum, they are obligate aerobes and they require 28 °C which is their optimal temperature for growth (Torres et al., 2009). Bacterial colonies grown on artificial medium are usually yellow due to the presence of pigment on the membranes known as xanthomonadin, which protects them against oxidative damage (He et al., 2011). Among this genus, the *X. axonopodis* species affects a wide range of hosts, including some economically important crop species (Hayward, 1993) such as beans (*Phaseolus vulgaris*), where it develops the common bacterial blight disease caused by the pathovar *phaseoli*.

This disease, even with all the damages caused in the

al., 2009). Las colonias bacterianas crecidas en medio artificial son usualmente amarillas debido a la presencia de pigmento en las membranas conocido como xanthomonadina, el cual las protege del daño oxidativo (He *et al.*, 2011). Dentro de este género, la especie *X. axonopodis* afecta a un amplio rango de hospedantes, encontrándose especies cultivadas de importancia económica (Hayward, 1993), entre ellos el frijol (*Phaseolus vulgaris*) ocasionando la enfermedad del tizón común bacteriano causado por el patovar *phaseoli*.

Esta enfermedad, aún con el daño que provoca en los campos de cultivo, como la reducción en el rendimiento de hasta un 47 %, no se encuentra en status regulado. En México se ubica dentro de los primeros cuatro problemas fitosanitarios que afectan al cultivo, principalmente en las áreas productoras del Altiplano (López, 1991).

Los síntomas del tizón común bacteriano son manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por un delgado halo amarillo. Estas manchas pueden desarrollarse en el borde o en diferentes áreas de las hojas. Esta bacteria (Xap y Xff) se encuentran presente en un 83 % de las áreas de producción de semilla y hasta un 79 % en campos comerciales del cultivo, reduciendo los rendimientos hasta en un 55 %, siendo mayores a temperaturas de 27 °C y alta humedad relativa (Fourie, 2002). En las vainas y semillas ocasiona manchas rojizas irregulares con presencia de exudados amarillos cuando la humedad relativa es superior al 80 %. También pueden afectar las semillas, las cuales se tornan arrugadas, o pueden permanecer asintomáticas y manifestarse en las plantas desarrolladas (Saettler, 1989).

Actualmente, la enfermedad es controlada por la aplicación de algunos métodos como los tratamientos químicos, el manejo cultural del cultivo, el control biológico, y el uso de variedades resistentes, principalmente.

Diversos estudios sobre el patovar *phaseoli* como: la sobrevivencia epifítica, diversidad genética, genes de virulencia y patogenicidad, entre otros (Mahuku *et al.*, 2006; Prudencio-Sains *et al.*, 2008; Jacques *et al.*, 2005), resultaron en la propuesta de diferentes alternativas de control del patógeno, tal como el empleo de variedades resistentes (Liu *et al.*, 2009), y más recientemente la inducción de resistencia sistémica mediante microorganismos benéficos (Osdaghi *et al.*, 2011).

El propósito del presente escrito es revisar aspectos fundamentales del patógeno, los mecanismos de dispersión del inóculo, sus efectos fisiológicos sobre las plantas, y el manejo de la enfermedad que se emplea actualmente. Todo esto con la finalidad de contribuir al entendimiento del comportamiento del agente causal del tizón común bacteriano.

Características generales. Hasta 1984 el género *Xanthomonas* comprendía seis especies entre las cuales la especie *X. axonopodis* no figuraba como tal. El agente causal del tizón común bacteriano era conocido como *X. campestris* pv. *phaseoli* (Bradbury *et al.*, 1984). No fue hasta 1995 cuando se propone la reclasificación del género por Vauterin *et al.*, (1995). El manual de bacteriología sistemática de Bergey's (Saddler y Bradbury,

fields, such as yield reduction up to 47 %, is still not in quarantined status. In Mexico, it is located within the first four phytosanitary problems that affect the crop, especially in growing areas of the Altiplano (Lopez, 1991).

Symptoms of common bacterial blight are irregular necrotic leaf spots surrounded by a thin yellow halo. These spots may develop on the edge or in different area of the leaves. This bacteria (Xap and Xff) is present in 83 % of the seed production areas and up to 79 % in commercial fields, reducing the yields by up to 55 % and higher when temperature is around 27 °C and high relative humidity (Fourie, 2002). In the pods and seeds it causes irregular reddish stains with presence of yellow exudates when the relative humidity is above 80 %. It can also affect the seeds, which become wrinkled seeds, or may remain asymptomatic and manifest later in the developed plants (Saettler, 1989).

Nowadays, the disease is controlled by applying some methods such as chemical treatments, cultural crop management, biological control and use of resistant varieties. Diverse studies on pathovar *phaseoli* such as: the epiphytic survival, genetic diversity, pathogenicity and virulence genes among others (Mahuku *et al.*, 2006; Prudencio-Sains *et al.*, 2008; Jacques *et al.*, 2005), resulted in a proposal of different alternatives for the pathogen control, such as the use of resistant varieties (Liu *et al.*, 2009), and more recently the induction of systemic resistance by beneficial microorganisms (Osdaghi *et al.*, 2011).

The purpose of this paper is to review key aspects of the pathogen, the inoculum dispersal mechanisms, its physiological effects on plants, and disease management that is currently used. All this with the aim of contributing to the understanding of the behavior of the causal agent of common bacterial blight.

General characteristics. Until 1984, *Xanthomonas* genus comprised six species and *X. axonopodis* was not part of it. The causal agent of common bacterial blight was known as *X. campestris* pv. *phaseoli* (Bradbury *et al.*, 1984). It was until 1995 when the reclassification of the genus is proposed by Vauterin *et al.*, (1995). Currently, Bergey's manual of systematic bacteriology (Saddler and Bradbury, 2005) classifies this agent as follows:

Division: Bacteria.

Phylum XIV: Proteobacteria

Class III: Gammaproteobacteria

Order III: Xanthomonadales

Family I: Xanthomonadaceae

However, due to various taxonomic reclassifications, the current nomenclature of the 19 species and 140 pathovars that conform the *Xanthomonas* genus, is still subject to debate according to Rademaker *et al.* (2005).

There are two variants of this agent in the Vauterin *et al.* (1995) reclassification, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf). The latter agent has been reclassified as a new species by using restriction enzymes (El-Sharkawy and Huisingsh, 1971), plasmid profile (Lazo and Gabriel, 1987) and DNA hybridization, being allocated as *X. fuscans* subs. *fuscans* (Xff) (Schaad *et al.*, 2005).

2005) ubica a este agente de la siguiente manera:

División: Bacteria

Phylum XIV: Proteobacteria

Clase III: Gammaproteobacteria

Orden III: Xanthomonadales

Familia I: Xanthomonadaceae

Sin embargo, debido a varias reclasificaciones taxonómicas, la nomenclatura actual de las 19 especies y 140 patovares que conforman el género *Xanthomonas* está aún sujeta a debate según Rademaker *et al.* (2005).

Existen dos variantes de este agente reconocido en la reclasificación por Vauterin *et al.*, (1995), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) y *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *Fuscans* (Xapf). Este último agente se ha reclasificado como una nueva especie, mediante el uso de enzimas de restricción (El-sharkawy y Huisingh, 1971), perfil de plasmidos (Lazo y Gabriel, 1987) e hibridación de DNA, asignándose como *X. fuscans* subs. *fuscans* (Xff) (Schaad *et al.*, 2005).

El tamaño promedio del genoma de Xap es de 3850.6 ± 48.9 y 3584.3 ± 68.1 kb para Xff, la confirmación de la diferencia genética de los dos agentes fue corroborada mediante la electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE, del inglés pulse-field gel electrophoresis) y por los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés restriction fragment length polymorphism) con la enzima de restricción *Xba1* (Chan y Goodwin, 1999b). Un mapa físico del cromosoma BXP65 de Xff se ha construido por PFGE e hibridación Southern (Chan y Goodwin, 1999a) lo cual ha permitido una mejor comprensión de la taxonomía y virulencia de este fitopatógeno.

Estudios previos demostraron que las cepas de Xap y Xff eran genéticamente diferentes y que podrían ser agrupados dentro de cuatro linajes distintos, tres correspondientes a Xap y el restante a Xff. Las cepas de Xap mostraron ser más heterogéneas que los de Xff (Alavi *et al.*, 2008).

X. axonopodis pv. *phaseoli* crece en medios de cultivo artificiales como TB y KB con morfología colonial de color amarillo mucoso no fluorescente (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Xff en medio YDCA produce un pigmento café difusible. No producen endosporas, son motiles con flagelación polar y son considerados aerobios obligados presentando metabolismo oxidativo (Saddler y Bradbury, 2005).

Ambas bacterias presentan diferencias en los requerimientos nutricionales. Así por ejemplo, pueden utilizar manitol, maltosa y trealosa como fuente de carbono (Cuadro 1) (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Inducen una reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, son negativas en la pudrición de papa, no se desarrollan en presencia de cloruro de sodio al 2.5 %, e hidrolizan gelatina (Osdaghi 2010). Una característica particular del agente Xff es la hidrólisis de almidón, lo cual se manifiesta por un área translúcida que rodea a las colonias en un medio conteniendo dicho compuesto y es visible aún sin la revelación con lugol (Jacques *et al.*, 2005).

Técnicas de diagnóstico. Estas van desde el uso de

The average size of Xap genome is 3850.6 ± 48.9 and 3584.3 ± 68.1 kb for Xff, confirmation of the genetic difference of these two agents was assessed by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and polymorphisms by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Xba1* as restriction enzyme (Chan and Goodwin, 1999b). A physical map of chromosome BXP65 of Xff was built by PFGE and Southern hybridization (Chan and Goodwin, 1999a) which has allowed a better understanding of the taxonomy and virulence of this plant pathogen.

Previous studies showed that Xap and Xff strains were genetically different and that they could be grouped into four different lineages, three corresponding to Xap and the remaining to Xff. Xap strains were more heterogeneous than those of Xff (Alavi *et al.*, 2008).

X. axonopodis pv. *phaseoli* grows in artificial media such as TB and KB with colonial morphology of non-fluorescent yellow mucoid (Abd-Alla and Bashandy, 2010). Xff in YDCA media produces a diffuse brown pigment. They do not produce endospores, they are motile with polar flagellation and they are considered aerobic obligated showing oxidative metabolism (Saddler and Bradbury, 2005).

Both agents have differences in nutritional requirements. For example, they can use mannitol, maltose and trehalose as a carbon source (Table 1) (Abd-Alla and Bashandy, 2010). They induce a hypersensitive reaction in tobacco leaves, they are negative in the potato rot, they do not develop in the presence of 2.5 % sodium chloride and they hydrolyze gelatin (Osdaghi 2010). A particular Xff characteristic is the starch hydrolysis, which is manifested by a translucent area surrounding the colonies on a medium containing such compound and is visible even without lugol detection (Jacques *et al.*, 2005).

Diagnostic techniques. These range from the use of screening tests in seeds with or without symptoms (Karavina *et al.*, 2008), use of bacteriophages (Kahveci and Maden, 1994), selective media (Sheppard *et al.*, 2007), serological tests such as immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Wong, 1991), PCR (Audy *et al.*, 1994) and hybridizations with PCR and RFLP (Zamani *et al.*, 2011).

There are also several semi-selective culture media such as MT (Goszczyńska and Serfontein, 1998), XCP1 (Popović *et al.*, 2009) and more recently the PTSA (Denardin and Agostini, 2013), which provides better development and counting of bacterial colonies. However, the semi-selective culture medium more used is MXP which contains potato starch, because several antibiotics and other chemicals can be used on this medium such as crystal violet, which limits the growth of Gram-positive bacteria, Cephalixin, that inhibit enterobacteria growth, and antibiotic kasugamycin which limits *Pseudomonas* growth (Jacques *et al.*, 2005).

Routine techniques to test batches of bacteria-free seed use serological testing such as immunofluorescence cell staining and ELISA. The drawback of serological tests is that they do not distinguish between viable and non-viable cells and the specificity of the reactions is highly dependent

Cuadro 1. Comportamiento bioquímico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap).
 Table 1. Biochemical behavior of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap).

Pruebas bioquímicas		Pruebas bioquímicas	
Tinción Gram	-	Crecimiento en NaCl 0, 2, 4, 6 y 8 %	+
Pigmentos fluorescentes	-		
Metabolismo oxidativo/fermentativo	+	Producción ácida de: Glucosa	+
Solubilidad KOH	+	Sacarosa	+
Producción de levana	-	Maltosa	+
Hidrólisis de gelatina	-	Lactosa	-
Hidrólisis de esculina	+	Galactosa	+
Hidrólisis de Tween 80	+	Trehalosa	+
Hidrólisis de caseína	+	Celobiosa	+
Hidrólisis de almidón	+	Manitol	+
Prueba oxidasa de Kovac	-	Glicerol	+
Reducción de nitratos	-	Glucitol	-
Deshidrolosa de arginina	-	Arabinosa	+
Producción de ureasa	-	D-alanina	-
Producción de Indol	-	D-prolina	-
Producción de H ₂ O desde cisteína	-	Patogenicidad	+

pruebas para detección en semillas con o sin síntomas (Karavina *et al.*, 2008), uso de bacteriófagos (Kahveci y Maden, 1994), medios de cultivo selectivos (Sheppard *et al.*, 2007), pruebas serológicas como la inmunofluorescencia y el ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés enzyme-linked immunosorbent assay) (Wong, 1991), PCR (Audy *et al.*, 1994), e hibridaciones con PCR y RFLP (Zamani *et al.*, 2011).

También se han desarrollado varios medios de cultivo semiselectivos como el MT (Goszczyńska y Serfontein, 1998), XCP1 (Popović *et al.*, 2009) y más recientemente el PTSA (Denardin y Agostini, 2013), el cual provee mejor desarrollo y conteo de las colonias bacterianas. No obstante, el medio de cultivo semiselectivo más empleado es el MXP el cual contiene almidón de papa, dado que sobre este mismo medio pueden utilizarse varios antibióticos y otros químicos, tales como cristal violeta, el cual limita el crecimiento de bacterias Gram-positivas, Cefalexina, que inhiben el crecimiento de enterobacterias, y

on the quality of the antibodies.

Some PCR amplification techniques have been used for detection and identification of these bacteria. In general, PCR assays are fast and very specific, but quantification is difficult and amplification is prone to inhibition by contaminants in seed samples. Flow cytometry (FCM) is a useful technique for fast multiparameter analysis and quantification of particles, such as bacterial cells. The analysis is based on the size and granulometry, and it uses fluorescent light emission after staining with a fluorescent dye (Tebaldi *et al.*, 2010).

Global distribution. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* is present in most of the world. Its distribution is partially associated with its ability to infect the seeds of both resistant and susceptible genotypes. For example, in Serbia 20 out of 23 commercially seeded bean cultivars are susceptible (Popovic *et al.*, 2009). In Iran, the disease was first observed in the summer of 1998, studies in the following years showed that the disease increased in growing regions of the

kasugamicina antibiótico que limita el crecimiento de las *Pseudomonas* (Jacques *et al.*, 2005).

Las técnicas de rutina para probar lotes de semilla libres de la bacteria emplean pruebas serológicas como la inmunofluorescencia por tinción de células y también la técnica ELISA. El inconveniente de las pruebas serológicas es que ninguna discrimina entre células viables y no viables y la especificidad de las reacciones es muy dependiente de la calidad de los anticuerpos.

Para la detección e identificación de esta bacteria, también se han descrito algunas técnicas de amplificación por PCR. En general, los ensayos de PCR son rápidos y muy específicos, pero la cuantificación es difícil y la amplificación es propensa a la inhibición por contaminantes presentes en las muestras de semillas. La citometría de flujo (FCM) es una técnica que permite de manera rápida el análisis multiparamétrico y la cuantificación de partículas, tales como las células bacterianas. El análisis se basa en el tamaño y granulometría, y puede emplear la emisión de luz fluorescente, después de teñir con un tinte fluorescente (Tebaldi *et al.*, 2010).

Distribución Mundial. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* se encuentra presente en gran parte del mundo. Su distribución esta parcialmente asociada con su habilidad para infectar las semillas de ambos genotipos resistentes y susceptibles. Así por ejemplo, en Serbia 20 de 23 cultivares de frijol comercialmente sembrados son susceptibles (Popović *et al.*, 2009). En Irán la enfermedad se observó por primera vez en el verano de 1998, los estudios realizados en los siguientes años mostraron que la enfermedad aumentó en las regiones del cultivo en la provincia de Markazi donde se detectó que las pérdidas en campos equipados con sistema de riego por aspersión se incrementaron la enfermedad (Lak *et al.*, 2002).

En el continente Africano se registró su presencia principalmente en Sudáfrica, donde se detectó en 682 campos de producción de semilla (Fourie, 2002), en Uganda se registró hasta un 40 % en la pérdida de rendimiento en los cultivos de frijol (Saettler, 1989), Egipto reportó que en granos almacenados por largos períodos de tiempo 5 muestras de cada 7 resultaron contaminadas con la bacteria (Abd-Alla y Bashandy, 2010). Las semillas provenientes de Zimbabwe analizadas mediante dos métodos de detección arrojaron que, ambas, semillas guardadas por largo tiempo así como las semillas certificadas estaban contaminadas con este agente, siendo las semillas con mayor tiempo de almacenamiento las que presentaron mayor nivel de población bacteriana (Karavina *et al.*, 2008).

En el continente Americano también se tienen registros. En Ontario, Canadá, Wallen y Jackson (1975) reportaron una pérdida en rendimiento del 38 %. En los Estados Unidos, los problemas con esta bacteria se registran en regiones productoras de frijol como lo son Colorado, Nebraska, y Wyoming en donde la enfermedad volvió a surgir después de una ausencia de más de 30 años (Harveson y Schwartz, 2007). En Brasil se encuentra diseminada en todas las regiones productoras de frijol, no obstante los mayores daños se reportaron en los estados de Paraná, Rio de Janeiro, Sao Paulo y en la región central de Brasil

Markazi province where it was found that the losses in fields equipped with sprinkler irrigation systems, increased the disease (Lak *et al.*, 2002).

In the African continent, its presence was recorded mainly in South Africa, where it was detected in 682 fields of seed production (Fourie, 2002), in Uganda it was reported up to 40 % yield loss in bean crops (Saettler, 1989), Egypt reported that in grains stored during long periods of time, 5 out of 7 samples were found to be contaminated with the bacteria (Abd-Alla and Bashandy, 2010). The seeds analyzed from Zimbabwe using two detection methods, showed that both seeds, the ones stored during long periods of time as well as the certified ones, were contaminated with this agent, being the seeds stored during long periods of time the ones higher level of bacterial population (Karavina *et al.*, 2008).

There are also records in the American continent. In Ontario, Canada, Wallen and Jackson (1975) reported a 38 % loss yield. In the United States, the problems with this bacteria are in the bean producing regions such as Colorado, Nebraska and Wyoming, where the disease re-emerged after an absence of more than 30 years (Harveson and Schwartz, 2007). In Brazil it is scattered in all bean growing regions, however, the major damage was reported in the states of Paraná, Rio de Janeiro, Sao Paulo and in the central region of Brazil (Pereira-Torres *et al.*, 2009). In Mexico the common bacterial blight disease is recorded since 1991, and it represents one of the most common diseases in bean fields (Campos, 1991).

Economic importance. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) is a bacteria that attacks worldwide bean cultivars (*P. vulgaris*), however, it also attacks crops such as *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray., *Vigna aconitifolia* L., *V. unguiculata* L., *V. radiata* L., *Lablab purpureus* L., *Mucuna deeringiana* (Bort.), *Lupinus polyphyllus* (Lindl.), *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., y *Echinochloa crus galli* L., (de O. Carvalho *et al.*, 2011; Gent *et al.*, 2005). In the bean crops the *fuscans* subspecies can survive as endophytic or epiphytic form in crop residues as well as in the seeds, and it can be transmitted by the vascular channels until affecting plant shoots (Jacques *et al.*, 2005).

The entry of bacteria to plants is via stomata and hydathodes. In foliar surfaces, it survives in spaces protected from the environment such as the stomata, the basal part of the trichomes and in the unevenness of the rib forming a protective biofilm (Jacques *et al.*, 2005). It is a bacteria that shares similar characteristics with other species of the same genus, as the type III secretion system, which is a transport system that allows the bacteria to enter the host cell proteins (Hajri *et al.*, 2009).

The pathovar *phaseoli* is an agent of economic importance for several reasons. The most prominent is because it attacks one of the most widely consumed crops in the world, beans (*P. vulgaris*). This legume is part of the human food diet and is a rich source of carbohydrates (fiber, starch and oligosaccharides), vegetable protein, vitamins and minerals such as folic acid and iron, as well as antioxidants and almost no fat (Mederos, 2013).

In 2006, the bean industry was valued at 180 and

(Pereira-Torres *et al.*, 2009). En México la enfermedad del tizón común bacteriano se registra desde 1991, y representa una de las enfermedades más frecuentes en los campos de cultivo del frijol (Campos, 1991).

Importancia económica. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) es una bacteria que ataca al cultivo de frijol (*P. vulgaris*) en todo el mundo, no obstante también ataca a cultivos como *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray., *Vigna aconitifolia* L., *V. unguiculata* L., *V. radiata* L., *Lablab purpureus* L., *Mucuna deeringiana* (Bort.), *Lupinus polyphyllus* (Lindl.), *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., y *Echinochloa crus galli* L., (de O. Carvalho *et al.*, 2011; Gent *et al.*, 2005). En el cultivo del frijol la subespecie *fuscans* puede sobrevivir en forma endófito y epífita en los residuos de la cosecha así como en las semillas, puede transmitirse por los conductos vasculares hasta afectar los brotes de las plantas (Jacques *et al.*, 2005).

La entrada de la bacteria a las plantas es a través de estomas e hidátodos. En las superficies foliares, sobrevive en espacios protegidos del ambiente como en los estomas, la parte basal de los tricomas y en los desniveles de las nervaduras formando una biopelícula de protección (Jacques *et al.*, 2005). Es una bacteria que comparte características similares con otras especies del mismo género, como el Sistema de Secreción Tipo III, el cual es un sistema de transporte que permite a la bacteria introducir proteínas a la célula hospedero (Hajri *et al.*, 2009).

El patovar *phaseoli* es un agente de importancia económica por diversas razones. La más sobresaliente es debido a que ataca a uno de los cultivos de mayor consumo en el mundo, el frijol (*P. vulgaris*). Esta leguminosa forma parte de la dieta alimentaria humana y es una fuente rica en carbohidratos (fibra, almidón, y oligosacáridos), proteína vegetal, vitaminas y minerales como ácido fólico y hierro, así como antioxidantes y muy poca cantidad de grasa (Mederos, 2013).

En el mundo, en 2006, la industria del frijol fue valuada en 180 y 1,200 millones de dólares en Canadá y los Estados Unidos respectivamente (<http://www.pulsecanada.com/>, consultada el 18 de Septiembre de 2013). En países como Brasil y México donde la actividad agrícola es una importante fuente de trabajo y de divisas por la exportación del producto se ve severamente perjudicada por la afectación de amplias extensiones de cultivo por esta bacteria. Tan solo en 2012, en México se sembró 1, 700, 513 ha (Fuente: SAGARPA, 2012).

La bacteria Xap no solo ataca al frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de campo, sino también especies emparentadas como: *P. lunatus* L., *Vigna aconitifolia* L. y *V. radiata* L., *Lablab purpureus* L. y *Mucuna deeringiana* (Bort.), considerados como posibles hospederos naturales. *Phaseolus coccineus* L., *P. acutifolius* Gray. y *Lupinus polyphyllus* (Lindl.) son hospederos por inoculación artificial (Bradbury, 1986). También ataca en invernadero a especies como *Vigna unguiculata* L. (de O. Carvalho *et al.*, 2011), *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus galli* L., entre otras especies (Gent *et al.*, 2005).

1,200 million dollars in Canada and United States respectively (<http://www.pulsecanada.com/>, accessed September 18th, 2013). In countries such as Brazil and Mexico where agriculture is an important source of employment and foreign exchange by exporting this product, it is severely damaged by the infection of large crops areas by this bacteria. Only in 2012, there were 1,700,513 ha seeded in Mexico (Source: SAGARPA, 2012).

Under field conditions, the Xap bacteria not only attacks bean crops (*Phaseolus vulgaris* L.), but also related species such as: *P. lunatus* L., *Vigna aconitifolia* L. and *V. radiata* L., *Lablab purpureus* L. and *Mucuna deeringiana* (Bort.) considered as potential natural hosts. *Phaseolus coccineus* L., *P. acutifolius* Gray and *Lupinus polyphyllus* (Lindl.) are hosts by artificial inoculation (Bradbury, 1986). It also attacks greenhouse species such as: *Vigna unguiculata* L. (de O. Carvalho *et al.*, 2011), *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus galli* L., among other species (Gent *et al.*, 2005).

Adverse effects of the disease are observed in both tropical and subtropical regions. The internally contaminated seeds or even externally contaminated, are the primary source of inoculum. It is estimated that a 1×10^3 cfu/ml inoculum concentration is sufficient to cause the disease (Darrasse *et al.*, 2007). The common bacterial blight has been one of the diseases that have led to big losses in bean cultivation on an industrial scale and on seeds production in various parts of the world, such as in Iran (Lak *et al.*, 2002) and South Africa (Fourie, 2002) which represents the main limiting factor for exportation.

Ethiopia reports that for every percentage increase in the severity of common bacterial blight, there is a loss of approximately 3.9- 14.5 kg/ha of seed (Tadele, 2006). Seeds exportation is affected because of the decline in quality due to the brownish color, mainly in white beans for the food industry (Yu *et al.*, 2000), but there is also a high risk of bacteria propagation in seeds that do not show visible symptoms due to the low density of bacterial population in the seed or that are below the levels of detection (Osdaghi *et al.*, 2010). Lastly, the attempt to control the disease favors the production costs.

Dispersion mechanisms and physiological effects.

X. axonopodis pv. *phaseoli* is mainly spread through the seeds. The minimum concentration required to have a successful contamination must be higher than 1×10^3 cfu/mL, once inside this is a vehicle that keeps it asymptomatic for long periods of time until the growth of the new plant (Darrasse *et al.*, 2007). The bacteria inside the seed can survive by forming a film or biofilm that protects it from adverse environmental conditions. It can also survive in plant debris and soil, and during the pounding of raindrops they can be taken to the aerial parts of the plants and enter through natural openings or wounds (Jacques *et al.*, 2005).

A peculiarity of this species is that it can colonize other plant species such as sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) or amaranth (*Amaranthus* sp. L.) under conditions of high humidity and temperature. When temperature is cool and rainfall is low, the pathogen survives from 65 to 180 d in the seedlings of the soil surface,

Los efectos adversos de la enfermedad son observados tanto en regiones tropicales como en subtropicales. Las semillas contaminadas internamente o incluso externamente constituye la fuente primaria del inoculo. Se calcula que una concentración del inoculo de 1×10^3 ufc/mL es suficiente para causar la enfermedad (Darrasse *et al.*, 2007). El tizón común bacteriano ha sido una de las enfermedades que han conducido a grandes pérdidas en el cultivo de frijol a escala industrial en la producción de semillas en varias partes del mundo, como en Irán (Lak *et al.*, 2002), y Sudáfrica (Fourie, 2002) donde representa la principal limitante para su exportación.

En Etiopia se reporta que por cada porcentaje de aumento de la severidad del tizón común bacteriano hay una pérdida de aproximadamente 3.9 a 14.5 kg/ha de semilla (Tadele, 2006). La exportación de semillas se ve afectada debido a la disminución de la calidad por la coloración café, principalmente en el frijol blanco, para la industria alimenticia (Yu *et al.*, 2000), pero también existe un alto riesgo de propagación de la bacteria en semillas que no manifiestan síntomas visibles debido a una baja densidad de población bacteriana en la semilla o que son inferiores a los niveles de detección técnica (Osdaghi *et al.*, 2010). Finalmente, el intento de control de la enfermedad propicia el aumento en los costos de producción.

Mecanismos de dispersión y efectos fisiológicos.

X. axonopodis pv. *phaseoli* se disemina principalmente a través de la semilla. La concentración mínima requerida para que la contaminación sea exitosa debe ser superior a 1×10^3 ufc/ml, una vez dentro de esta constituye un vehículo que la mantiene por largos periodos de manera asintomática hasta el crecimiento de la nueva planta (Darrasse *et al.*, 2007). Dentro de la semilla la bacteria puede sobrevivir mediante la formación de una película o biofilm que la protege de las condiciones ambientales desfavorables. También puede sobrevivir en restos vegetales y en el suelo, durante el golpeteo de las gotas de lluvia puede ser llevado a las partes aéreas de las plantas y entrar a través de aberturas naturales o heridas (Jacques *et al.*, 2005).

Una peculiaridad de esta especie es que puede colonizar otras especies vegetales como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) o el amaranto (*Amaranthus* sp. L.) bajo condiciones de alta humedad y temperatura. Con temperaturas frescas y lluvias escasas el patógeno sobrevive de 65 a 180 d en las plántulas sobre la superficie del suelo, y de 30 a 120 d una vez incorporadas al suelo (Torres *et al.*, 2009). En estas especies vegetales sin embargo, se ha observado que las poblaciones son menores comparativamente a las encontradas en las plantas de frijol y la sobrevivencia epifítica de este agente es menor (Gent *et al.*, 2005).

El tizón común bacteriano ocurre frecuentemente en climas templados y tropicales. Una característica importante para el desarrollo de la enfermedad son los factores de virulencia y en las especies de *Xanthomonas* se han reconocido varios, entre ellos las estructuras de la superficie bacteriana, principalmente los polisacáridos extracelulares como el xantano. Este polisacárido causa el marchitamiento en las plantas por la obstrucción del flujo

and from 30 to 120 d once incorporated into the soil (Torres *et al.*, 2009). In these plants, however, it has been observed that populations are comparatively lower than those found in the bean plants and the epiphytic survival of this agent is lower too (Gent *et al.*, 2005).

The common bacterial blight occurs frequently in temperate and tropical climates. An important characteristic for the development of the disease include the virulence factors and in the *Xanthomonas* species several of them have recognized, including bacterial surface structures, mainly the extracellular polysaccharides like xanthan. This polysaccharide causes wilting in plants because of the obstruction of water flow in the xylem vessels. Experimental evidence also suggests that xanthan suppresses plant defense responses such as callus deposition in the plant cell wall, presumably by chelation of divalent calcium ions that are present in the extracellular spaces of the plant cell (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Another virulence factor are lipopolysaccharides, which are the major components of the bacterial external membrane that protects them against environmental conditions (Boher *et al.*, 1997).

The pathogenicity mechanisms of *Xanthomonas* species show certain similarity (Buttner and Bonas, 2010). Generally, the bacteria causes decreased photosynthesis by xanthan interference in the triose phosphate / phosphate exchange in the chloroplast membrane (Jiao *et al.*, 1999). Physiologically, this bacteria induces changes in the power source or causes a decoupling of proton pump in the plasmalemma, this causes a decrease in photosynthesis (Novacky, 1982). However, there are differences in aggressiveness between Xap and Xff agents, the latter turns out to be more aggressive (Mutlu, 2008).

These agents subsist within protoxilema gaps in a matrix of amorphous substance, a combination of dissolved cell wall materials with exopolysaccharides of the bacteria; possibly due to the reduction in the synthesis of sucrose that causes the presence of xanthan (Jiao *et al.*, 1996). The amorphous matrix is the compound that fills the intercellular spaces of the mesophyll during colonization of leaf tissue (Boher *et al.*, 1997). In cowpea plants (*Vigna unguiculata* L.), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* causes that mesophyll chloroplasts have morphological changes, making them more spherical. In some cases, disruption of the membrane and the accumulation of starch grains and chloroplasts is observed (de O. Carvalho *et al.*, 2011).

Disease progression causes the amorphous matrix to spread into parenchymal cells adjacent to the xylem, after dissolving the walls of the parenchymal cells and thus entering the xylem. If the entry of the bacteria is through the vascular tissue, it passes the xylem towards the neighboring cells or vascular bands through penetration of the intercellular spaces developed by dissolution of the cell walls between cells of the foliar mesophyll (de O. Carvalho *et al.*, 2011). However, the bacteria can also enter through the seeds.

Control methods. Some control methods currently used for the management of common bacterial blight give little or moderately effective results due to the nature of the infection or lack of use of the methods. Among the most

hídrico en los vasos del xilema. La evidencia experimental sugiere que el xantano también suprime las respuestas de defensa vegetal tal como la deposición de callosa en la pared celular vegetal, presumiblemente por la quelación de iones de calcio divalente que están presentes en los espacios extracelulares de la célula vegetal (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Otro factor de virulencia son los lipopolisacáridos, los cuales son los mayores componentes de la membrana externa bacteriana que las protege de las condiciones ambientales (Boher *et al.*, 1997).

Los mecanismos de patogenicidad que las especies de *Xanthomonas* emplean presentan cierta similitud (Buttner y Bonas, 2010). De manera general, la bacteria ocasiona disminución de la fotosíntesis, por la interferencia de xantano en el intercambio de las triosas fosfato/fosfato en la membrana de los cloroplastos (Jiao *et al.*, 1999). Fisiológicamente, esta bacteria induce cambios en la fuente de energía o produce un desacoplamiento en la bomba de protones en el plasmalema, esto ocasiona la disminución en la fotosíntesis (Novacky, 1982). No obstante, existen diferencias en la agresividad entre los agentes Xap y Xff, esta última resulta ser más agresiva (Mutlu, 2008).

Estos agentes subsisten dentro de las lagunas de protoxilema en una matriz de sustancia amorfa, una combinación de los materiales de la pared celular disueltos y los exopolisacáridos de la bacteria; posiblemente por la reducción en la síntesis de sacarosa que ocasiona la presencia del xantano (Jiao *et al.*, 1996). La matriz amorfa es el compuesto que va llenando los espacios intercelulares del mesófilo durante la colonización del tejido foliar (Boher *et al.*, 1997). En plantas de caupi (*Vigna unguiculata* L.), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* provoca que los cloroplastos del mesófilo presenten cambios morfológicos, volviéndolos más esféricos. En algunos casos se observa una desorganización de la membrana y la acumulación de granos de almidón y de cloroplastos (de O. Carvalho *et al.*, 2011).

La progresión de enfermedad ocasiona que la matriz amorfa se propague hacia el interior de las células parenquimatosas adyacentes al xilema, después de haber disuelto las paredes de las células del parénquima, y así pasan al interior del xilema. Si la entrada de la bacteria es a través del tejido vascular, ésta pasa del xilema hacia las células vecinas o bandas vasculares a través de la penetración de los espacios intercelulares desarrollados por la disolución de las paredes celulares entre las células del mesófilo foliar (de O. Carvalho *et al.*, 2011). No obstante, la bacteria también puede entrar a través de las semillas.

Métodos de control. Algunos métodos de control que se usan actualmente para el manejo del tizón común bacteriano dan resultados escasos o medianamente efectivos debido a la naturaleza de la infección o al desconocimiento de su uso. Entre estos resaltan el control químico, cultural, biológico, y mejoramiento genético principalmente.

Control químico. No existen reportes de control químico eficaces para esta enfermedad. No obstante, se han empleado diversos fungicidas como mezclas de Bordeaux, el oxiclورو de cobre, el sulfato de cobre, los cuales son aplicados antes de la aparición de los síntomas, así como también antibióticos como la Estreptomycin (Saettler,

common are: chemical control, cultural, biological and genetic improvement.

Chemical control. There are no reports of effective chemical control for this disease. However, various fungicides have been used such as Bordeaux mixture, copper oxychloride, copper sulfate, which are applied before the emergence of symptoms, as well as antibiotics such as streptomycin (Saettler, 1989). The high costs, potential chemical residues and resistance among Xap strains are the side effects of using these chemical applications. Foliar fertilizer applications have been successful, for example, the application of manganese reduced the severity of the disease by up to 49 % in bean plants under greenhouse conditions (Viecelli and Moerschbacher, 2013).

Because the seed is the primary vehicle for bacteria propagation, tolylfluand (1,1-dichloro-N-[(dimethylamino)-sulfonyl]-1-fluoro-N-(4-methylphenyl) methanesulfonamide) has been used as it has shown to reduce efficiently the transmission of bacteria from the seed to the plant compared to untreated seeds in laboratory and greenhouse experiments (Lopes *et al.*, 2008). The use of antibiotics for seeds treatment by soaking them in 25 % polyethylene glycol or 60 % glycerol has been very successful as germination does not decrease, although there is a slightly reduction in plant vigor (Liang *et al.*, 1992).

Antibiotics such as Tetracycline and Chlortetracycline in polyethylene glycol solutions, reduce more effectively the Xap population but usually they are phytotoxic. In contrast, solutions of polyethylene glycol with Streptomycin reduce, but do not eradicate, internal populations of the bacteria in seeds naturally contaminated and cause few phytotoxic effects (Liang *et al.*, 1992). Treatment with the antibiotic Streptomycin at 100 µg/ml plus 0.2 % Captan fungicide, or simply warm water (52 °C for 10 min) followed by addition of streptomycin (100 µg/mL) eradicate bacteria of naturally infected seeds and they reduce the number of infected seedlings from 80 % to 5 % in batches of inoculated seeds (Jindal 1991).

Cultural control. It is often mentioned that the use of disease-free seed is the adequate control for the disease. However, even with the use of non-contaminated seed it is possible the appearance of symptoms, mainly because the presence of one contaminated seed per 20,000 seeds is sufficient for transmission of the inoculum to the field (Darrasse *et al.*, 2007). Rotation of cultivars may be key in controlling the disease, however, it has been observed that resistant plants in temperate areas are as susceptible under other conditions as in the tropical zones (Gent *et al.*, 2005).

On the other hand, it is recommended that in the rotation of cultivars, the bean-onion scheme should be avoided as much as possible, since onions can provide a source of inoculum by asymptomatic epiphytic colonization (Gent *et al.*, 2005). Also, it should bear in mind that the use of sprinkler irrigation system favors the dispersion of bacteria compared with other irrigation systems (Akhavan *et al.*, 2013). A recommended practice is to remove weeds and other susceptible host plants around the crop (Ovies and

1989). Los altos costos, residuos químicos potenciales y la resistencia entre las cepas de Xap son los efectos adversos del uso de estas aplicaciones químicas. Las aplicaciones de fertilizantes foliares ha dado buenos resultados, por ejemplo, la aplicación de manganeso redujo la severidad de la enfermedad hasta en un 49 % en plantas de frijol bajo invernadero (Viecelli y Moerschbacher, 2013).

Debido a que la semilla es el principal vehículo de propagación de la bacteria, se han utilizado químicos como tolifluanida (1,1-dicloro-N-[(dimetilamino)-sulfonil]-1-fluoro-N-(4-metilfenil) metanosulfonamida) el cual ha mostrado reducir la transmisión de la bacteria de la semilla a la planta comparado a semillas no tratadas en experimentos de laboratorio e invernadero (Lopes *et al.*, 2008). El uso de antibióticos para el tratamiento de semillas por inmersión en polietilenglicol al 25 % o glicerol 60 % da buenos resultados, no disminuye la germinación, aunque sí reduce ligeramente el vigor de las plantas (Liang *et al.*, 1992).

Antibióticos como la Tetraciclina y Clorotetraciclina en soluciones de polietilenglicol, reducen con mayor efectividad la población de Xap, pero suelen ser fitotóxicos. En cambio, las soluciones de polietilenglicol con Estreptomina reducen pero no erradican las poblaciones internas de la bacteria en semillas contaminadas naturalmente y causan pocos efectos fitotóxicos (Liang *et al.*, 1992). El tratamiento con el antibiótico Estreptomina a razón de 100 µg/mL más el fungicida Captan al 0.2 %, o simplemente en agua caliente (52 °C por 10 minutos) seguido por la adición de Estreptomina (100 µg/mL) erradican la bacteria de semillas infectadas naturalmente y reducen el número de plántulas infectadas desde un 80 % al 5 % en lotes de semilla inoculados (Jindal 1991).

Control cultural. Con frecuencia se alude que el empleo de semillas libres de enfermedades es la adecuada para el control de esta enfermedad. No obstante, aún con el empleo de semilla no contaminada es posible la aparición de síntomas, debido principalmente a que con la presencia de una semilla contaminada por cada 20,000 es suficiente para la transmisión del inoculo al campo de cultivo (Darrasse *et al.*, 2007). La rotación de cultivares puede ser clave en el control de la enfermedad, no obstante, se ha observado que plantas resistentes en zonas templadas son susceptibles bajo otras condiciones como en las zonas tropicales (Gent *et al.*, 2005).

Por otra parte, se recomienda que en la rotación de cultivos se evite en lo posible el esquema frijol-cebolla, dado que la cebolla puede proveer una fuente de inóculo por la colonización epífita asintomática (Gent *et al.*, 2005). Asimismo, se debe tener en cuenta que el uso del sistema de riego por aspersión favorece la dispersión de la bacteria en comparación con otros sistemas de riego (Akhavan *et al.*, 2013). Una práctica recomendada es la eliminación de malezas susceptibles y de otras plantas hospederas de los alrededores del cultivo (Ovies y Larrinaga, 1988). El manejo de las fechas de siembra que eviten las condiciones óptimas de desarrollo de la enfermedad también son recomendados.

Control biológico. Dentro de este apartado destaca el empleo de microorganismos benéficos principalmente bacterianos, ya sea para la antibiosis o por la inducción de

Larrinaga, 1988), as well as a proper management of planting dates to avoid the optimal conditions for disease development.

Biological control. This section highlights the use of beneficial microorganisms mainly bacteria, either for antibiosis or by inducing systemic resistance. For example, it has been observed that some bacterial isolates from *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus* and *Rhodococcus fascians* that are compatible with *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, show protective activity against Common Bacterial Blight; the effect is attributed to a systemic protection as it has been shown that plants from microbiolized seeds were able to generate callus (Zanatta *et al.*, 2007).

In comparison studies it was observed that some *Paenibacillus polymixa* strains produce peptidic metabolites that inhibit *X. campestris* pv. *phaseoli* growth in vitro after 12 hours of incubation, they also reduce the incidence of the disease in vivo of up to 28 (Mageshwaran *et al.*, 2011; Mageshwaran *et al.*, 2012). Also, some *Pseudomonas* sp. and *Rahnella aquatilis* strains have shown up to 39 % of efficient control of this disease when applied from the seeds, mainly by the formation of phenolic compounds and high peroxidase activity (da Silva *et al.*, 2008; Sallam, 2011).

The mechanism by which the seed microbiolization produces this result is not fully understood, however, evidences suggests that these compounds cause metabolic changes in the plants, especially by increasing the content of total soluble protein and the activity polyphenol oxidase (Silva *et al.*, 2009). Other microorganisms such as *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* have been evaluated for their ability to change the resistance of common bean cultivars obtaining seeds of higher weight in the field (Osdaghi *et al.*, 2011).

Additionally, compounds with inducing activity such as Bion and BioZell-2000® have also been used as they have not shown inhibitory effect on the pathogen when applied directly, but when applied to the plants they suppress the onset of the common bacterial blight disease by 68 % and 50 % and thus a decrease in bacterial population of up to 50 % and 45 %, respectively (Abo-Elyousr, 2006). Substances like acibenzolar-S-methyl were tested as inducers of resistance to this bacteria in the fields, although under greenhouse conditions the product is not efficient (Soares *et al.*, 2004).

Breeding control. Bean plants improvement to this pathogen has been done by identifying and using quantitative trait locus distributed throughout the genome, which are expressed under the influence of the environment, pressure of pathogen selection, maturity and plant tissue (seed, leaf or sheath) (Santos *et al.*, 2003). From this, two promising lines with high yield and resistance to water stress have been developed, which manifest characteristics of common bacterial blight resistance such as the TRAS-MST1 line that comes from the intersection of two bean cultivars developed in Mexico (Porch *et al.*, 2012).

In the search of genetic resistance, special emphasis has been given to genes determining the pathogenesis of

resistencia sistémica. Se ha observado por ejemplo, que algunos aislados bacterianos de *Pseudomonas* sp., *Bacillus cereus*, y *Rhodococcus fascians* que son compatibles con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, presentan actividad protectora contra la enfermedad del Tizón Común Bacteriano; el efecto es atribuido a una protección sistémica al ser comprobado que las plantas provenientes de semillas microbiolizadas eran capaces de generar callosidad (Zanatta *et al.*, 2007).

En estudios de confrontación se ha observado que algunas cepas de *Paenibacillus polymixa* producen metabolitos de naturaleza peptídica que inhiben el crecimiento de *X. campestris* pv. *phaseoli* in vitro después de 12 h de incubación, también reducen la incidencia de la enfermedad in vivo de hasta un 28 (Mageshwaran *et al.*, 2011; Mageshwaran *et al.*, 2012). De igual manera, algunas cepas de *Pseudomonas* sp. y *Rahnella aquatilis* han mostrado controlar eficientemente hasta en un 39 % esta enfermedad al ser aplicados desde las semillas, principalmente por la formación de compuestos fenólicos y la alta actividad peroxidasa (da Silva *et al.*, 2008; Sallam, 2011).

El mecanismo por el cual la microbiolización de las semillas produce este resultado no se encuentra totalmente entendido, no obstante, las evidencias apuntan a que estos compuestos provocan alteraciones metabólicas en las plantas, principalmente por el aumento en el contenido de proteínas solubles totales y la actividad polifenol oxidasa (Silva *et al.*, 2009). Otros microorganismos como *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* se han evaluado por su capacidad para activar la resistencia de cultivares de frijol común lográndose obtener semillas de mayor peso en el campo (Osdaghi *et al.*, 2011).

También se han utilizado compuestos con actividad inductora como el Bion y BioZell-2000[®], los cuales no muestran tener efecto inhibitorio sobre el patógeno cuando son aplicados directamente pero aplicados a las plantas suprimen la aparición de la enfermedad del tizón común bacteriano hasta en un 68 % y 50 % y con ello una disminución de la población bacteriana del 50 % y 45 % respectivamente (Abo-Elyousr, 2006). Sustancias como el acibenzolar-S-methyl se han probado como inductores de resistencia ante esta bacteria en los campos de cultivo, aunque en invernadero el producto no resulta ser eficiente (Soares *et al.*, 2004).

Control por mejoramiento genético. El mejoramiento de las plantas de frijol ante este patógeno ha sido realizado mediante la identificación y aprovechamiento de Locus de Caracteres Cuantitativos distribuidos a través de todo el genoma, los cuales se expresan bajo la influencia del ambiente, presión de selección del patógeno, madurez y tejido de la planta (semilla, hoja o vaina) (Santos *et al.*, 2003). A partir de esto, se han desarrollado dos líneas promisorias con alto rendimiento y resistencia al estrés hídrico que manifiestan características de resistencia al tizón común bacteriano como la línea TRAS-MST1, la cual proviene del cruce de 2 cultivares de frijol desarrollados en México (Porch *et al.*, 2012).

En la búsqueda de resistencia genética se ha hecho

this bacteria (Darsonval *et al.*, 2008). For example, some effectors have been recognized in this genre with an alleged role in the suppression of plant defenses (Kay and Bonas, 2009). Hajri *et al.* (2009) identified two classes of genes within the T3E repertoires (type III effectors) (*avrBs2*, *xopN*, *xopF1*, *xopX*, *phA1*, *xopE2*, *avrXacE3* and *xopQ*). The products of these genes may play different roles in the pathogenesis of the strains. According to the pathogenicity, the core T3E genes could provide virulence functions of broad utility and then label components widely conserved among a wide host range. The loss of these ubiquitous T3E repertoires may lead to competitiveness loss for the pathogen (Hajri *et al.*, 2009).

The way in which the bean plants recognize these potential inducers has not been fully elucidated. However, the presence of small RNA sequences known as miRNA, which mediate gene expression and participate in the signaling events in host-parasite interaction *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-*Manihot esculenta* (yuca), has been recognized. In this interaction it has been found differential expression of 56 miRNA families in the yuca plant (*Manihot esculenta* C.) in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, some of the most important are: miR160, miR167, miR390 and miR393, which affect auxin receptors and thus regulate the auxin signaling (Perez-Quintero *et al.*, 2012).

Sources of genetic resistance to this pathogen have been identified in both bean and related species, *P. aculifolius* y *P. coccineus*, however, many of them are also inherited as a quantitative trait locus (QTL) and vary in their levels of genetic effects and their expressions are influenced by environmental conditions (Kelly *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006). Lastly, the audacity of the causal agent of the common bacterial blight has surpassed all these control barriers.

CONCLUSIONS

Common Bacterial Blight has been extensively studied and is a frequent problem in bean crops. However, the pathogen variability and the diversity of identification and diagnostic techniques, suggest the importance of selecting carefully the most appropriate ones for this pathogen studies. On the other hand, the disease management is directed towards implementing the use of resistance genes through varietal improvement and induction of plant resistance by biotic or abiotic inducers. However, the best management would be given by the knowledge of the pathogen and its prevention through incorporation of suitable management and control methods.

LITERATURA CITADA

- Abd-Alla, M.H., and Bashandy, S.R. 2010. Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:291-292.
- Abo-Elyousr, K.A. 2006. Induction of systemic acquired resistance against common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Egyptian Journal of Phytopathology 34:41-50.

especial énfasis en los genes determinantes de la patogénesis de esta bacteria (Darsonval *et al.*, 2008). Por ejemplo, se han reconocido algunos efectores de este género con presunto papel en la supresión de defensas vegetales (Kay y Bonas, 2009). Hajri *et al.* (2009) identificaron dos clases de genes dentro los repertorios T3E (efectores tipo III) (*avrBs2*, *xopN*, *xopF1*, *xopX*, *phA1*, *xopE2*, *avrXacE3* y *xopQ*). Los productos de estos genes pueden jugar distintos papeles en la patogenia de las cepas. Acorde a la patogenicidad, los genes del núcleo T3E podrían proveer funciones de virulencia de amplia utilidad y entonces etiquetar componentes ampliamente conservados entre un amplio rango de hospederos. La pérdida de estos repertorios T3E ubicuos podría conducir a la pérdida de competitividad para el patógeno (Hajri *et al.*, 2009).

La forma en que las plantas de frijol reconocen a estos posibles inductores no se ha definido completamente. Sin embargo, se reconoce la presencia de pequeñas secuencias de ARN conocidas como miRNA que median la expresión genética y participan en los eventos de señalización en la interacción parásito hospedero *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-*Manihot esculenta* (yuca). En esta interacción se ha encontrado la expresión diferencial de 56 familias miRNA en la planta de yuca (*Manihot esculenta* C.) en respuesta a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, algunas de las más importantes son la miR160, miR167, miR390, y miR393, los cuales afectan a los receptores de auxina y por lo tanto regulan la señalización de auxinas (Pérez-Quintero *et al.*, 2012).

Las fuentes de resistencia genética a este patógeno han sido identificados tanto en frijol como en especies relacionadas, *P. aculifolius* y *P. coccineus*, no obstante muchos de ellos también son heredados como locus de caracteres cuantitativos (QTL) y varían en sus niveles de efectos genéticos y sus expresiones están influenciados por las condiciones ambientales (Kelly *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2006). Finalmente, la audacia del agente causal del tizón común bacteriano ha superado todas estas barreras de control.

CONCLUSIONES

El Tizón Común Bacteriano se ha estudiado ampliamente y representa un problema frecuente en los campos de cultivo de frijol. No obstante, la variabilidad del patógeno y la diversidad de técnicas de identificación y diagnóstico sugieren seleccionar con cautela las más apropiadas para propósitos de estudio del patógeno. Por otro lado, el manejo de la enfermedad es dirigido hacia la implementación del uso de los genes de resistencia a través del mejoramiento varietal y la inducción de la resistencia vegetal mediante inductores bióticos o abióticos. Sin embargo, el mejor manejo estaría dado por el conocimiento del patógeno y la prevención del mismo mediante la integración de los diferentes métodos apropiados para su manejo y control.

Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. 2008. Assessment of the genetic

diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. Applied and Environmental Microbiology 74:3295-3301.

Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M.R., Nazemi, A., and Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. Springer Plus 2:41.

Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C., and Gilbertson, R.L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *x-c phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain-reaction. Phytopathology 84:1185-1192.

Bradbury, J.F. 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. p. 187. In: Krieg NR and Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. London, England 199-210.

Bradbury, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute. London, England 332p.

Boher, B., Nicole, M., Potin, M., and Geiger, J.P. 1997. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. Molecular Plant-Microbe Interaction 10: 803-811.

Buttner, D., and Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS Microbiology Review 34:107-133.

Campos, A.J. 1991. Enfermedades del frijol. Editorial Trillas. Primera edición. México 70 - 73.

Chan, J., and Goodwin, P.H. 1999a. A physical map of the chromosome of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* BXP65. Fems Microbiology Letters 180: 85-90.

Chan, J., and Goodwin, P.H. 1999b. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. European Journal of Plant Pathology 105:867-878.

Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E., and Jacques, M.A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. European Journal of Plant Pathology 119:203-215.

Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C. and Jacques, M. 2008. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. Applied and Environmental Microbiology 74: 2669-2678.

da Silva, E.G., Moura, A.B., Deuner, C.C. y Farias, D.R. 2008. Estudo de mecanismos de biocontrole do crestamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. Revista Ceres 55:377-383.

Denardin, N.D.Á., and Agostini, V.A. 2013. Detection and

- quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans* in common bean seeds. *Journal of Seed Science* 35:428-434.
- de O. Carvalho, A., Cunha, M.D., Rodríguez, R., Sudré, C.P., Santos, I.S., Fernández, K.V.S., Rabelo, G.R., and Gomes, V.M. 2011. Ultrastructural changes during early infection of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* leaves by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and an unexpected association between chloroplast and mitochondrion. *Acta Physiologia Plantarum* 33:2025-2033.
- El-Sharkawy, T.A., and Huisinigh, D. 1971. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *Journal of General Microbiology* 68:155-2033.
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *Journal of Phytopathology Phytopathologische Zeitschrift* 150:220-226.
- Gent, D.H., Lang, J.M., and Schwartz, H.F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89:558-564.
- Goszczyńska, T., and Serfontein, J.J. 1998. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods* 32:65-72.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., and Lemaire, C. 2009. A “repertoire for repertoire” hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 4: e6632.
- Harveson, R.M., and Schwartz, H.F. 2007. Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2007-0125-01-DG.
- Hayward, A.C. 1993. The hosts of *Xanthomonas*. p. 1-95. In: Swings J and Civerolo EL. *Xanthomonas*. Chapman and Hall, Ltd. London, England 1-119.
- Heitz, T., Segond, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Prasad, V., and Brunner, F. 1994. Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis related (PR) protein a new plant chitinase/lysozyme. *Mol. Gen. Genet* 245:246-254.
- He, Y.W., Wu, J.E., Zhou, L., Yang, F., He, Y.Q., Jiang, B.L., and Zhang, L.H. 2011. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 948-957.
- Hildebrand, D.C., Palleroni, N.j., and Schroth, M.N. 1990. Deoxyribonucleic- acid relatedness of 24 *Xanthomonas* strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 263-269.
- <http://www.pulsecanada.com>. (Consultada el 18 de Septiembre de 2013).
- Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied Environmental Microbiology* 71:2008-2015.
- Jiao, J., Grodzinski, B., and Goodwin, P. 1996. Photosynthesis and export during steady-state photosynthesis in bean leaves infected with the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Canadian Journal of Botany* 74:1-9.
- Jiao, J., Goodwin, P., and Grodzinski, B. 1999. Inhibition of photosynthesis and export in geranium grown at two CO₂ levels and infected with *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. *Plant Cell and Environmental* 22:15-25.
- Jindal, K.K. 1991. Physical and chemical agents for the eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from bean seeds. *Plant Disease Research* 6:68-71.
- Kahveci, E., and Maden, S. 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by bacteriophages. *Journal of Turkish Phytopathology* 23:79-85.
- Karavina, C., Chihiya, J., and Tigere, T.A. 2008. Detection and characterization of *Xanthomonas phaseoli* (E. F. SM) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) seed collected in Zimbabwe. *Journal of Sustainable Development in Africa* 10:105-119.
- Kay, S., and Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol* 12:37-43.
- Kelly, J.D., Gepts, P., Miklas, P.N. and Coyne, D.P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res* 82:135-154.
- Lak, M.R., Shams-bakhsh, M., and Bahar, M. 2002. Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resource* 6:231-243.
- Lazo, G.R., and Gabriel, D.W. 1987. Conservation of plasmids DNA- sequences and pathovar identifications of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 77:448-453.
- Liang, L.Z., Halloin, J.M., and Saettler, A.W. 1992. Use of polyethylene-glycol and glycerol as carriers of antibiotics for reduction of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean-seeds. *Plant Disease* 76:875-879.
- Liu, S., Yu, K., and Park, S.J. 2009. Marker-assisted breeding for resistance to common bacterial blight in common bean. In: *Plant Breeding*, Huttunen, N., and Sinisalo, T. (eds), pp. 211-226. Nova Scientific Publisher, New York, U.S.A.
- López, F. L. C. 1991. Definición de prioridades de investigación fitopatológica para la zona templada del Altiplano Central de México. *Agricultura Técnica Mexicana* 17:17-54.
- Lopes, L.P., Alves, P.F.R., Zandoná, C., Nunes, M.P., and Mehta, Y.R. 2008. A semi-selective medium to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and its eradication through seed treatment with tolylfluanid.

- Summa Phytopathologica 34:287-288.
- Mageshwaran, V., Mondal, K.K., Kumar, U., and Annapurna, K. 2012. Role of antibiosis on suppression of bacterial common blight disease in French bean by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15. African Journal of Biotechnology 11:12389-12395.
- Mageshwaran, V., Walia, S., Govindasamy, V., and Annapurna, K. 2011. Antibacterial activity of metabolite produced by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15 against *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Indian Journal of Experimental Biology 49:229-233.
- Mahuku, G.S., Jara, C., Henriquez, M.A., Castellanos, G., and Cuasquer, J. 2006. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. Journal of Phytopathology 154:35-44.
- Mederos, Y. 2013. Revisión bibliográfica: indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas 27:55-62.
- Mhedbi-Hajri, N., Jacques, M.A., and Koebnik, R. 2011. Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae. Bacterial Adhesion 71-89.
- Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E., and Blair, M.W. 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. Euphytica 147:105-131.
- Mutlu, N. 2008. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subs. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. Plant Disease 92:546-554.
- Novacky, A. 1982. Relationship between membrane potential and ATP level in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* infected cotton cotyledons. Physiological Plant Pathology 21:237-249.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., and Lak, M.R. 2010. Study on common bean seed lots for contamination with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by BIO-PCR technique. Journal of Agricultural Technology 6:503-513.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., Reza-Lak, M., and Yhatami-Maleki, H. 2011. Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and decrease of common bacterial blight. Phytopathology Mediterranean 50:45-54.
- Ovies, J., and Larrinaga, L. 1988. Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* by a wild host. Ciencia y Técnica en la Agricultura, Protección de Plantas 11:23-30.
- Pereira-Torres, J., Fernández-da, Silva-Junior, T.A., y Maringoni, A.C. 2009. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. Summa Phytopathol 35: 136-139.
- Pérez-Quintero, A.L., Quintero, A., Urrego, O., Vanegas, P., and López, C. 2012. Bioinformatic identification of cassava miRNAs differentially expressed in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. BMC Plant Biology 12:29.
- Popović, T., Balaž, J., Gavrilović, V., and Aleksić, G. 2009. Distribution and characterization of phytopathogenic bacteria on commercial bean crop in Vojvodina [Serbia]. Plant Protection 60:101-125.
- Porch, T.G., Urrea, C.A., Beaver, J.S., Valentin, S., Peña, P.A., and Smith, J.R. 2012. Registration of TARS-MST1 and SB-DT1 multiple-stress-tolerant black bean germplasm. Journal of Plant Registrations 6:75-80.
- Prudencio-Sains, J.M., Navarrete-Maya, R., Navarrete-Maya, J., y Acosta-Gallegos, J.A. 2008. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. Agricultura Técnica en México 34:201-212.
- Rademaker, J.L., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and Bruijn, F.J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95:1098-1111.
- Saddler, G.S., and Bradbury, J.F. 2005. Xanthomonadales ord. nov. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology 63-122.
- SAGARPA. 2012. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=202 (Consultada el 1 de Octubre de 2012).
- Sallam, N.M. 2011. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. Archives of Phytopathology And Plant Protection 44:20, 1966-1975.
- Santos, A.S., Bressan-Smith, R.E., Pereira, M.G., Rodrigues, R., and Ferreira, C.F. 2003. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira 28: 5-10.
- Saettler, A.W. 1989. Assessment of yield loss caused by common blight of beans in Uganda. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 35: 113-114.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., and Vidaver, A.K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *Citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. rem.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Systematic and applied microbiology 28:494-518.
- Sheppard, J., Kurowski, C., and Remeus, P.M. 2007. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. International Rules for Seed Testing 7-021.
- Silva, E.G.D., Moura, A.B., Bacarin, M.A., and Deuner,

- C.C. 2009. Metabolic alterations on bean plants originated from microbiolization of seeds with *Pseudomonas sp.* and inoculated with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Summa Phytopathologica 35: 98-104.
- Soares, R.M., Maringoni, A.C., and Lima, G.P. 2004. Inefficiency of acibenzolar-S-methyl in induction of resistance against bacterial wilt in common bean. Fitopatologia Brasileira 29: 373-377.
- Tadele, T. 2006. Effect of common bacterial blight severity on common bean yield. Tropical Science 46: 41-44.
- Tebaldi, N.D., Peters, J., Souza, R.M., Chitarra, L.G., Zouwen, P., Bergervoet, J., and Wolf, J. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. Tropical Plant Pathology 35: 213-222.
- Torres, J.P., Maringoni, A.C., and Silva, T.A.F. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in Common Bean Leaflets on Soil. Journal of Plant Pathology 91: 195-198.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 472-489.
- Viecelli, C.A., and Moerschbacher, T. 2013. Control of the common bacterial blight in the bean crop by using foliar fertilizers. Scientia Agraria Paranaensis 12: 66-72.
- Wallen, V.R., and Jackson, H.R. 1975. Model for yield loss determination of bacterial blight of field beans utilizing aerial infrared photography combined with field plot studies. Phytopathology 65: 942-948.
- Wong, W.C. 1991. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. Journal of Applied Bacteriology 71: 124-129.
- Yu, K., Park, S.J. and Poysa, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. Plant Breed 119: 411-415.
- Zamani, Z., Bahar, M., Jacques, M.A., Lak, M.R., and Akhavan, A. 2011. Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 2371-2378.
- Zanatta, Z. G.C.N., Moura, A.B., Maia, L.C., y dos Santos, A.S. 2007. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Brazilian Journal of Microbiology 38: 511-515.

Etiología de la Marchitez de Plantas de Chayote (*Sechium edule*) en el Estado de Veracruz

Etiology of Chayote (*Sechium edule*) Wilting Plants in the State of Veracruz

Gildardo Olguín Hernández, Guadalupe Valdovinos Ponce, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco Edo. de México. CP 56230, México; **Jorge Cadena Íñiguez**, Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados. Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. CP 78600, México; **Ma. de Lourdes Arévalo Galarza**, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco Edo. de México. CP 56230, México. Correspondencia: gvapon@colpos.mx

(Recibido: Junio 05, 2013 Aceptado: Enero 08, 2014)

Olguín Hernández G, Valdovinos Ponce G, Cadena Íñiguez J y Arévalo Galarza ML. 2013. Etiología de la Marchitez de Plantas de Chayote (*Sechium edule*) en el estado de Veracruz. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 161-169.

Resumen. México es el principal productor y exportador de chayote (*Sechium edule*) verde liso a nivel mundial. En Veracruz, en donde se produce más del 70 % del volumen nacional, la marchitez de plantas se presentó desde 1990 como uno de los problemas fitosanitarios principales del cultivo. El objetivo de este trabajo fue determinar la etiología de la marchitez de plantas de chayote en la región Centro del estado de Veracruz. En el ciclo de producción 2011-2012, se muestrearon 14 plantas con marchitez y se obtuvieron las raíces cercanas a la zona de origen de brotes nuevos. Se cortaron 30 segmentos de la zona de avance del tejido necrosado, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 %, se lavaron con agua estéril y se sembraron en los medios de cultivo PARPNH, PDA y V8-agar. En condiciones de invernadero, se inocularon las guías basales de 60 plantas mediante la colocación de esporangios. Los síntomas aparecieron 22 d después de la inoculación como marchitamiento y amarillamiento foliar. De las plantas inoculadas se re-aisló e identificó molecular y morfológicamente a *Phytophthora capsici*, reportándolo por primera vez en México como el agente causal de la marchitez de plantas de *S. edule* en Veracruz.

Palabras clave adicionales: *Phytophthora capsici*, marchitamiento, diagnóstico, identificación molecular.

El fruto de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) se cosecha en madurez hortícola a los 18 ± 2 días después de anthesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena *et al.*, 2007) y se consume principalmente como verdura. El cultivo evolucionó comercialmente de hortaliza de traspatio a producto de

Abstract. Mexico is the main producer and exporter of smooth green chayote (*Sechium edule*) worldwide. In the state of Veracruz, where it is produced more than 70 % of the national volume, wilting of chayote plants has been there since 1990 as an important phytosanitary problem. The objective of this work was to determine the etiology of wilting plants of chayote in the Central region of state of Veracruz. During the 2011-2012 production cycle, 14 plants with wilting symptoms were sampled, and roots were harvested at the shoot emerging zone. Thirty segments were dissected at the advancing zone of necrotic tissue, disinfested with 3 % sodium hypochlorite, washed with sterile distilled water and cultured onto PARPNH, PDA and V8-agar media. The basal guides of 60 plants were inoculated by sporangium deposition and kept under greenhouse conditions. Symptoms appeared 22 d after inoculation as wilting and yellowing of leaves. *Phytophthora capsici* was reisolated from the inoculated plants, and identified molecular and morphologically for first time in Mexico as the causal agent of the *S. edule* wilting plants in Veracruz.

Additional keywords: *Phytophthora capsici*, wilting, diagnosis, molecular identification.

The fruit of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) is harvested at horticultural maturity of 18 ± 2 d after anthesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena *et al.*, 2007) and is mainly consumed as a vegetable. This crop evolved commercially from backyard vegetable to exportation product with high demand in United States and Canada, ranking within the non-traditional vegetables of highest importance in national exports (Cadena *et al.*, 2001). It has social importance because of the manpower required, for example, in a 4 ha commercial orchard, 30 to 35 people (80 % women) are employed for a period of 6-9 months; in addition, because

exportación con amplia demanda en Estados Unidos y Canadá, ubicándose dentro de las hortalizas no tradicionales de mayor importancia en la exportación nacional (Cadena *et al.*, 2001). Tiene importancia social por la mano de obra que demanda, ya que en una huerta comercial de 4 ha se emplean de 30 a 35 personas (80 % mujeres) por un periodo de 6 a 9 meses; además, debido a que el fruto se puede dañar fácilmente, su cosecha y empaque requieren mano de obra adicional (GISeM, 2008).

Como resultado del éxito comercial del chayote en los mercados de Norteamérica, la superficie de la producción nacional como monocultivo ha aumentado considerablemente, lo que generó la aparición de problemas fitosanitarios, principalmente la marchitez de plantas, que no solo limitan el volumen y la calidad de la producción, sino también ponen en riesgo las fuentes de empleo (GISeM, 2011).

En México, la zona de producción de chayote más importante se ubica en la región central de Veracruz, en los municipios de Coscomatepec, Huatusco, Ixhuatlán del Café, Chocamán, Tlilapan, Orizaba, Rafael Delgado, Amatlán de los Reyes, Cuichapa e Ixtaczoquitlan (Cadena *et al.*, 2010).

Durante los meses de mayor precipitación (junio-noviembre), incrementa la incidencia de plantas de chayote con síntomas de marchitez por pudrición de raíces. Los productores asocian estos síntomas con *Phytophthora* sp. y aplican para su control fungicidas a base de metalaxyl, lo cual reduce la incidencia; sin embargo, no existen reportes que indiquen que *Phytophthora* sp. sea el agente causal. Olguín (2010), reportó la asociación de *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum* con los mismos síntomas, pero el estudio no comprobó que estos hongos fueran los agentes causales primarios de la enfermedad. La falta de conocimiento sobre la etiología de este problema fitosanitario ha mermado la productividad del cultivo y debido a la aplicación indiscriminada de fungicidas, se han incrementado los costos de producción y el riesgo de seleccionar organismos resistentes al metalaxyl y mfenoxam, sin que exista un control eficiente (FRAC, 2012; Jackson *et al.*, 2010; Café y Ristiano, 2008; Lamour y Hausbeck, 2000). Con base en estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología de la marchitez de plantas de chayote en huertas comerciales de dos localidades de la región central de Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zonas de muestreo. Las zonas de muestreo se localizaron en Tlaltengo (1480 msnm, 97° 00' de longitud oeste y 19° 05' de latitud norte) y Huatusco (1300 msnm, 95° 58' de longitud oeste y 19° 09' de latitud norte) en los municipios de Coscomatepec y Huatusco, respectivamente en Veracruz, México (Soto y Gómez, 1994; Cadena *et al.*, 2005). Dichas localidades forman parte de la principal región productora de chayote, en donde prevalece vegetación de bosque pino-encino y mesófilo de montaña (Vázquez *et al.*, 1992). Las plantaciones se manejan en condiciones de temporal y con densidades de plantación que varían de 100-128 plantas por hectárea.

the fruit can be easily damaged, its harvesting and packaging require additional labor (GISeM, 2008).

As a result of the commercial success of chayote in North American markets, the area of national production as monoculture has increased considerably, which led to the emergence of phytosanitary problems, mainly the wilting plants, which not only limit the amount and quality of production, but also threaten the employment opportunities (GISeM, 2011).

In Mexico, the most important chayote production area is located in the central region of Veracruz, in the municipalities of Coscomatepec, Huatusco, Ixhuatlán del Café, Chocamán, Tlilapan, Orizaba, Rafael Delgado, Amatlán de los Reyes, Cuichapa and Ixtaczoquitlan (Cadena *et al.*, 2010).

During the months of highest precipitation (June-November), the incidence of chayote wilting plants with root rots increases. Producers associate these symptoms with *Phytophthora* sp. and they apply metalaxyl based fungicides for its control, which reduces the incidence; however, there are no scientific reports indicating that *Phytophthora* sp. is the causal agent. Olguín (2010), reported the association of *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* with the same symptoms, but the study did not show that these fungi were the primary causal agents of the disease. The lack of knowledge about the etiology of this phytosanitary problem has reduced the crop productivity and due to the indiscriminate application of fungicides, production costs and the risk of selecting metalaxyl and mfenoxam resistant organisms, have increased without existing an efficient control (FRAC, 2012; Jackson *et al.*, 2010; Café y Ristiano, 2008; Lamour y Hausbeck, 2000). Based on this background, the aim of this study was to determine the etiology of chayote wilting plants in commercial orchards of two locations in the central region of Veracruz.

MATERIALS AND METHODS

Sampling areas. The sampling areas were located in Tlaltengo (1480 masl, 97° 00' west longitude and 19° 05' north latitude) and Huatusco (1300 masl, 95° 58' west longitude and 19° 09' north latitude) in Coscomatepec and Huatusco municipalities respectively in Veracruz, Mexico (Soto y Gómez, 1994; Cadena *et al.*, 2005). These locations are part of the main chayote producing region, where the prevailing vegetation are the pine-oak and cloud forests (Vázquez *et al.*, 1992). The plantations are managed under rainfall conditions with and plant densities ranging from 100-128 plants per hectare.

Symptoms characterization and isolation of microorganisms. Commercial orchards of smooth green chayote were surveyed during June, August and October 2011. The wilting plants were identified visually because of their sagging and dark coloration of the leaves (Figure 1A) and the soft consistency of watery appearance of the basal guides (guías basales). For the isolation of microorganisms, it was cut the transition zone between stem and root (this is the origin area of new shoots where the cortex and vascular tissue showed lesions of necrotic appearance and exudates)

Caracterización de síntomas y aislamiento de microorganismos. Se recorrieron parcelas comerciales de chayote verde liso en los meses de junio, agosto y octubre del 2011. Las plantas con síntomas de marchitez se localizaron de forma visual por la flacidez y coloración oscura de las hojas (Figura 1 A) y por la consistencia blanda de apariencia acuosa de las guías basales. Se cortó la zona de transición entre el tallo y la raíz (zona de origen de brotes nuevos en donde la corteza y el tejido vascular presentaron lesiones de apariencia necrótica y exudados) (Figura 1 B) de 11 y 3 plantas recolectadas en Coscomatepec y Huatusco respectivamente, para hacer el aislamiento de microorganismos.

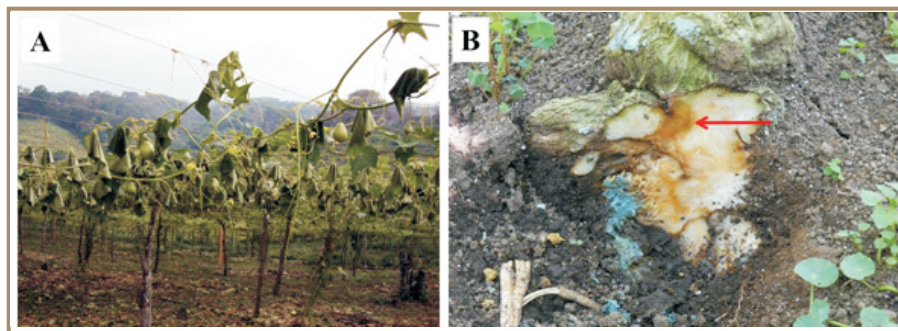


Figura 1. Plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso con síntomas de marchitez (A) en huerta comercial en la región central de Veracruz, México 2011. Zona de infección y avance de la necrosis (tejido de transición entre tallo y raíz) (B).
 Figure 1. Smooth green chayote (*Sechium edule*) plants with wilting symptoms (A) in a commercial orchard in central Veracruz, Mexico 2011. Infection area and necrosis progression (tissue transition between stem and root) (B).

Pruebas de patogenicidad

Aislamiento de microorganismos. La zona de transición entre el tallo y las raíces de cada una de las 14 plantas se disectó en 30 fragmentos de 5 mm de longitud. Las 420 muestras obtenidas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % por 4 min, se lavaron por 3 min con agua destilada estéril y se secaron completamente con sanitas esterilizadas. Las muestras se cultivaron equitativamente en PARPNH (jugo V8 con pimaricina 0.01 g, ampicilina 0.25 g, rifampicina 0.01 g, pentacloronitrobenzeno 0.05 g e himexazol 0.05 g) (Erwin y Ribeiro, 1996), PDA y V8 (jugo V8 300 mL, CaCO₃ 4.5 g, agar 20 g) acidificado con ácido láctico al 25 % durante 48 h a 30 ± 2 °C en oscuridad continua.

Los hongos y oomicetes que crecieron se transfirieron y purificaron en PDA y V8-agar frescos mediante las técnicas de cultivos monoconidiales y monozoospóricos, respectivamente. Los oomicetes purificados se utilizaron para realizar las pruebas de patogenicidad e identificación (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008; Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

Preparación del inóculo. El inóculo se preparó a partir del microorganismo que tuvo el valor más alto en la frecuencia de aislamientos, y se obtuvo de cultivos de 6 días de crecimiento en medio V8-agar. Cinco rodajas de medio de cultivo con crecimiento micelial de 1.0 cm de diámetro se transfirieron a 100 mL de medio V8-líquido con dos gotas de

(Figure 1 B) of 11 and 3 plants collected in Coscomatepec and Huatusco respectively.

Pathogenicity tests

Isolation of microorganisms. The transition zone between the stem and roots of each of the 14 plants were dissected into 30 pieces of 5 mm length. The 420 samples obtained were disinfested with 3 % sodium hypochlorite for 4 min, washed for 3 min with sterile distilled water and thoroughly dried with sterile paper towers. The samples were cultured equitably in PARPNH (V8 juice with 0.01g pimaricin, 0.25g ampicillin, 0.01g rifampicin, 0.05g pentachloronitrobenzene and 0.05 g hymexazol) (Erwin and Ribeiro, 1996), PDA and V8 (300 mL of V8 juice, 4.5 g

CaCO₃, 20 g agar) acidified with 25 % lactic acid for 48 h at 30 ± 2 °C in continuous darkness.

Grown fungi and oomycetes were transferred and purified on fresh PDA and V8-agar using monoconidials and mono zoosporic culture techniques, respectively. Purified Oomycetes were used for pathogenicity tests and identification (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008; Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

Inoculum preparation. The inoculum was prepared with the most frequently isolated microorganism; it was obtained from 6 d old cultures growth on V8-agar medium. Five slices of culture medium with 1.0 cm in diameter mycelial growth were transferred to 100 ml of V8-liquid medium with two drops of 25 % lactic acid. The oomycete was cultured at 25 ± 2 °C without agitation and after 5 d of growth, it was transferred on to 90 mm in diameter Petri dishes with 6 mL of sterile distilled water. Cultures were maintained under white light at 25 ± 2 °C for 24 h to induce the sporangia formation. The inoculum concentration was adjusted to 11,500 sporangia mL⁻¹.

Inoculation and reisolation. Sixty plants were inoculated at 28 d after they were sown. Ten mL of the sporangial suspension were placed on the base of the first shoot emitted by the fruit. As a control experiment, sterile distilled water was placed at the base of the first shoot of 20 plants at the same development stage than those inoculated with sporangia. All plants were kept under a 50/50 shade cloth in a greenhouse at 28 ± 3 °C, and 70 % relative

ácido láctico al 25 %. El oomicete se cultivó a 25 ± 2 °C sin agitación y después de 5 d se transfirió a cajas Petri de 90 mm de diámetro con 6 mL de agua destilada estéril. Los cultivos se mantuvieron bajo luz blanca a 25 ± 2 °C durante 24 h para inducir la formación de esporangios. La concentración del inóculo se ajustó a 11,500 esporangios mL⁻¹.

Inoculación y reaislamiento. Se inocularon 60 plantas a los 28 días después de la siembra. Se colocaron 10 mL de la suspensión de esporangios en la base del primer brote emitido por el fruto. Como tratamiento testigo se depositó agua destilada estéril en la base del primer brote de 20 plantas en la misma etapa de desarrollo que las inoculadas con los esporangios. Todas las plantas se mantuvieron bajo malla sombra (50/50) en invernadero a 28 ± 3 °C, humedad relativa del 70 % y riego a saturación por 30 días. Una vez que las plantas mostraron los síntomas de marchitamiento, se reaislaron los microorganismos en medio de cultivo V8-agar y PDA. Las colonias obtenidas se compararon morfológicamente con los aislamientos originales que se obtuvieron de las huertas comerciales.

Caracterización morfológica. Se describieron las características cualitativas y cuantitativas de 50 estructuras reproductivas sexuales (oogonio y anteridio) y 100 estructuras asexuales (esporangióforo y esporangios) crecidas en medio V8-agar. Se hicieron preparaciones semi-permanentes teñidas con azul de algodón y se observaron en un microscopio compuesto (VE-B6, Velab). El registro fotográfico se hizo con un microscopio Nikon Eclipse E400 con cámara integrada.

Las estructuras reproductivas sexuales se indujeron a partir del apareamiento entre uno de los aislamientos obtenidos de la zona de transición entre el tallo y la raíz de las plantas recolectadas en Huatusco, y un aislamiento obtenido de frutos de la misma especie recolectada en Cuautlapan, Veracruz.

La identificación del género se hizo con las claves de Erwin y Ribeiro (1996), y para especie con las descritas por Gallegly y Hong (2008). La determinación de género y especie de los aislamientos fungosos se hicieron con las claves de Barnett y Hunter (2006), y con las descritas por Leslie y Summerell (2006), respectivamente.

Identificación molecular. La extracción del ADN (Silva *et al.*, 2009; Bowers *et al.*, 2006) se hizo a partir de un cultivo de 4 d de crecimiento en medio líquido V8 a 20-25 °C. Se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en tubos Eppendorf de 200 µL con 30 µL de la solución de lisis (Lyse N Go, Pierce®, EE.UU.). Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 min y se centrifugaron (EBA21, Hettich® Zentrifuge) por 10 min a 3000 g. La amplificación del ADN de la región ITS se hizo con los iniciadores universales ITS6 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo la enzima 1 x Taq DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosidotrifosfatos (0.2mM cada uno), 100 ng de ADN, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de GoTaq DNA (Promega®, EE.UU.). Las amplificaciones se

hicieron en un tubo Eppendorf de 200 µL con 30 µL de agua destilada estéril. Las plantas se regaron hasta el punto de saturación por 30 d. Once plantas mostraron síntomas de marchitamiento, los microorganismos se reaislaron en V8-agar y PDA como medio de cultivo. Las colonias obtenidas se compararon morfológicamente con los aislamientos originales obtenidos de huertas comerciales.

Morphological characterization. Qualitative and quantitative characteristics of 50 sexual reproductive structures (oogonium and antheridium) and 100 asexual structures (sporangiophore and sporangia) grown on V8-agar medium were described. Semi-permanent preparations stained with cotton blue were made and observed under a compound microscope (VE-B6, Velab). The photographic record was made with a Nikon Eclipse E400 microscope with an integrated camera.

Sexual reproductive structures were induced by pairing one of the isolates obtained from the transition zone between the stem and root of plants collected in Huatusco, and one fruit isolate obtained from the same species collected in Cuautlapan, Veracruz.

Gender identification was done by using the Erwin and Ribeiro keys (1996), and the species with those described by Gallegly and Hong (2008). Genus and species designation of the fungal isolates were done following the Hunter (2006) and, Leslie and Summerell (2006), keys respectively.

Molecular identification. DNA extraction (Silva *et al.*, 2009; Bowers *et al.*, 2006) was done from a 4 d old culture growth in V8 liquid medium at 20-25 °C. Approximately 5mm mycelium were placed in 200 µL Eppendorf tubes with 30 µL of the lysis solution (Lyse N Go, Pierce®, USA). The samples were incubated at 95 °C for 5 min and centrifuged (EBA21, Hettich® Zentrifuge) for 10 min at 3000 g. DNA amplification of the ITS region was done with the ITS6 (5'-G G A A G T A A A A G T C G T A C A A G G -3') universal primers and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). The PCR reaction mixture was prepared in a final volume of 25 µL containing 1x Taq DNA polymerase enzyme, 0.8 mM deoxy nucleoside triphosphates (0.2mM each), 100 ng of DNA, 20 pmol of each primer and 2 units of DNA GoTaq (Promega®, USA). Amplifications were carried out in a thermal cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200; BIORAD®, Mexico) with an initial denaturation cycle at 95°C for 2 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, a final extension at 72 °C for 2 min, and a final amplification cycle at 72 °C for 10 min.

Amplification products were verified by gel electrophoresis on 1.2 % agarose gel in 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) at 87 V for 1 h. The gel was stained with ethidium bromide (3 mg L⁻¹) and DNA was visualized with a transilluminator (Gel Doc 2000 UV; BIORAD®, USA). The amplicons were purified with the QIAquick PCR kit (Qiagen®, USA) following the manufacturer's instructions, and sequenced in both directions with an automated Model 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems®, USA) to ensure correct nucleotides readings. The obtained sequences were aligned with those deposited in the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI,

hicieron en un termociclador (Peltier Thermal Cycler PTC-200; BIORAD®, México) con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, el alineamiento a 57 °C por 1 min, una extensión final a 72 °C por 2 min y un último ciclo de amplificación a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % en amortiguador TAE 1X (Tris Acetate- EDTA) a 87 V durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹) y el ADN se visualizó en un transiluminador (Gel Doc 2000 UV; BIORAD®, EE.UU.). Los amplicones se purificaron con el kit QIAquick PCR (Qiagen®, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de ADN modelo 3730XL (Applied BioSystems®, EE.UU.) para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas. Las secuencias obtenidas se alinearon con las depositadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012).

RESULTADOS

Reaislamiento de microorganismos. De los tejidos obtenidos de plantas con síntomas de marchitez se aislaron oomicetes, hongos y bacterias. *Phytophthora* sp. se presentó con mayor frecuencia en 129 (92 %) de los 140 fragmentos de tejido sembrados en PARPNH. En los 11 fragmentos restantes crecieron bacterias y hongos saprófitos que no se identificaron. En el medio V8-ácido láctico, *Phytophthora* sp. se aisló de 39 fragmentos de tejido (28 %), *Fusarium* sp. de cuatro y bacterias de 97. En PDA solamente se aisló a *Fusarium* sp. en 11 de los 140 fragmentos de los tejidos que se cultivaron. En seis y en dos de los 60 fragmentos de las guías basales de las plantas asintomáticas que se cultivaron en PDA crecieron bacterias y *Alternaria* sp., respectivamente. Solamente en tres de los 60 fragmentos mantenidos en V8-agar crecieron bacterias.

Reproducción de síntomas en invernadero. Veintidós días después de la inoculación (ddi), 54 de las 60 plantas inoculadas presentaron síntomas de flacidez de brotes tiernos y amarillamiento de las hojas (Figura 2A). La base de la guía se necrosó en el área inoculada (Figura 2B). Asimismo, a los 30 ddi, las guías basales se secaron

(2012).

RESULTS

Reisolation of microorganisms. Oomycetes, fungi and bacteria were isolated from tissues obtained of plants with wilting symptoms. *Phytophthora* sp. was present more frequently in 129 (92 %) out of 140 tissue fragments planted on PARPNH. In the remaining 11 fragments, some bacteria and saprophytic fungi were not identified. *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., and bacteria were isolated from 39 (28 %), 4, and 97 tissue fragments cultivated on V8-lactic acid medium, respectively. Only *Fusarium* sp. was isolated from 11 out of 140 tissue fragments cultured on PDA. Six and two out of 60 basal guide fragments of asymptomatic plants cultured on PDA showed bacteria and *Alternaria* sp., respectively. Bacteria grew in only three out of the 60 fragments maintained on V8-agar.

Symptoms reproduction under greenhouse conditions. Twenty two days after inoculation (dai), 54 out of 60 inoculated plants showed flaccid young shoots and leaf yellowing (Figure 2A). The base of the guide (base de la guía) got necrotic at the inoculated area (Figure 2B). Likewise, at 30 dai, basal guides dried out causing a premature leaf wilting (Figure 2C).

Morphological characterization. The oomycete grown on V-8 agar showed a white and a star like coenocytic mycelial growth. The sporangia formation was observed after 13 d of growth under natural light. In distilled water sporangia developed at 19 h of exposure in white light.

Sporangia developed in umbellate and simple sympodia (Figures 3A and 3B), showing ellipsoidal to lemon-like shapes of 58.71 x 29.28 µm (average of 100 sporangia), conspicuous papillae and a long pedicel (Figures 3C and 3D). They germinated directly as hyphae or with the formation of new sporangia (Figures 3E and 3F). Fifteen d after pairing, the oomycete developed oogonia with amphigynous antheridia and plerotic oospores (Figures 3G and 3H). These characteristics correspond to those described by Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) for *Phytophthora capsici*.

Molecular identification. The amplification product obtained with ITS4 and ITS6 primers, was a 650 bp band, corresponding to the size of the expected one. The



Figura 2. Reproducción de síntomas en plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso inoculadas en invernadero. Amarillamiento foliar (A) y necrosis de la guía basal en la zona de inoculación (B) (22 d después de la inoculación). Senescencia de hojas basales (C) (30 d después de la inoculación).

Figure 2. Reproduction of symptoms on smooth green chayote (*Sechium edule*) plants, inoculated under greenhouse conditions. Foliar yellowing (A) and necrosis of the basal guide at the inoculated area (B) (22 d after inoculation). Senescence of basal leaves (C) (30 d after inoculation).

provocando el marchitamiento prematuro de las hojas (Figura 2C).

Caracterización morfológica. El oomicete presentó crecimiento micelial cenocítico de tipo estrellado y color blanquecino en V8-agar. La formación de esporangios se observó a partir de los 13 d de crecimiento bajo condiciones de luz natural. En agua destilada los esporangios se desarrollaron a las 19 h de exposición en luz blanca.

Los esporangios se desarrollaron en cabezuelas y en simpodio simple (Figuras 3A y 3B), presentando forma

sequence analysis showed a 100 % similarity to the *P. capsici* JQ610200.1 sequence present in the NCBI genomic database (2012). The sequence was registered in the database with the accession number Jx871893 instead of access.

DISCUSSION

The results obtained in this research, showed that chayote wilting plants is not induced by *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* or *F. sambucinum*, as reported by Rivera *et al.* (1992) and Olguin (2010) in Costa Rica and Mexico, respectively. The symptoms described by these

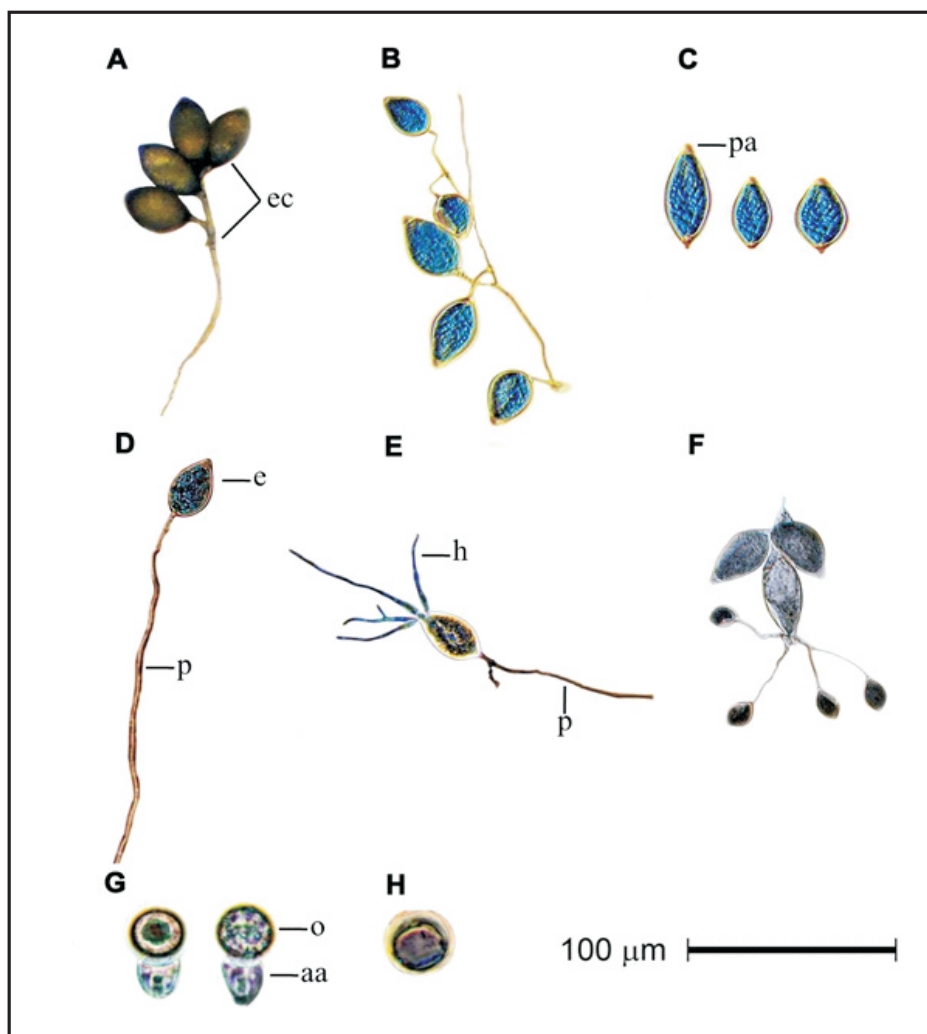


Figura 3. Estructuras diagnósticas de reproducción sexual y asexual de *Phytophthora capsici* aisladas de plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso con síntomas de marchitez crecidas en medio de cultivo V8-agar. (A) Esporangios en cabezuela. (B) Esporangios sobre simpodio simple. (C) Esporangios papilados. (D) Esporangio con pedicelo largo. (E) Germinación directa de esporangios emitiendo hifas y (F) Esporangios. (G) Oogonios con anteridios anfígenos. (H) Oospora. Anteridio anfígeno (aa), esporangio (e), esporangios en cabezuela (ec), hifa (h), oogonio (o), papila (pa), pedicelo (p).

Figure 3. Diagnostic structures of sexual and asexual reproduction of *Phytophthora capsici* isolated from smooth green chayote (*Sechium edule*) plants with wilting symptoms grown on V8-agar culture medium. (A) Sporangia in umbellate sympodium. (B) Sporangia in simple sympodia. (C) Papillate sporangia. (D) Sporangium with a long pedicel. (E) Direct germination of sporangia emitting hyphae and (F) sporangia. (G) Oogonia with an amphigynous antheridium (H) Oospore. Amphigynous antheridia (aa), sporangium (e), sporangia in umbellate sympodia (ec), hyphae (h), oogonium (o), papilla (pa), pedicel (p).

elipsoidal a limoniforme de 58.71 x 29.28 µm (promedio de 100 esporangios), papila conspicua y pedicelo largo (Figuras 3C y 3D). Germinaron directamente como hifas o con la formación de nuevos esporangios (Figuras 3E y 3F). El oomicete desarrolló oogonios con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas a los 15 d después del apareamiento (Figuras 3G y 3H). Las características anteriores corresponden con las descritas en las claves de Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) para *Phytophthora capsici*.

Identificación molecular. El producto de amplificación obtenido con los primers ITS4 e ITS6 fue de 650 pb, correspondiente al tamaño del amplicón esperado. El análisis de la secuencia mostró un 100 % de similitud con la secuencia JQ610200.1 de *P. capsici* depositada en la base de datos del NCBI (2012). La secuencia se registró en esta base con el número de acceso JX871893.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que la marchitez de las plantas de chayote no es inducida por *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* ni *F. sambucinum*, como lo reportaron Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) en Costa Rica y México, respectivamente. Los síntomas descritos por estos investigadores fueron pudrición de raíz, hojas cloróticas y senescencia prematura en plantas aisladas o distribuidas en manchones, lo cual coincide con los síntomas observados en las huertas comerciales evaluadas en esta investigación; en donde además de estos síntomas, las plantas presentaron hojas sin turgencia y deshidratación en la zona de la corona (área de distribución plagiotrópica de las guías).

Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010), no realizaron las pruebas de patogenicidad para determinar si *Pythium* sp. y las dos especies de *Fusarium* fueron los agentes primarios de la marchitez de las plantas. Es importante resaltar que el aislamiento de *Phytophthora* sp. a partir de tejido sintomático es más difícil que el de algunos hongos, incluyendo *Fusarium* spp., ya que los síntomas en los órganos aéreos se presentan una vez que la infección de las raíces ha avanzado. Bajo tales condiciones, patógenos secundarios, o parásitos y saprófitos facultativos (hongos y bacterias) invaden el tejido radical enmascarando el crecimiento de *Phytophthora* sp. (Mircetich y Browne, 1987).

De acuerdo con las claves taxonómicas de Erwin y Ribeiro (1996), se aisló a *Phytophthora* en el 92 y 28 % de los fragmentos de tejido con síntomas de marchitez que se cultivaron en PARPNH y V8-agar, respectivamente, *Fusarium* spp. (Barnett y Hunter, 2006) creció en el 3 % del tejido sembrado en V8-agar. La identificación morfológica a nivel de especie (Gallegly y Hong, 2008) y el análisis molecular indicaron que la especie corresponde a *P. capsici*. Estos resultados, complementados con las pruebas de patogenicidad, indicaron que *P. capsici* es el agente causal primario del marchitamiento de las plantas de chayote.

Los síntomas que se observaron en plantas de chayote infectadas natural y artificialmente fueron reducción en el crecimiento de raíces absorbentes y el

researchers were root rot, chlorotic leaves and premature senescence on plants distributed isolated or aggregately, which is consistent with the symptoms observed in the commercial orchards evaluated in this research; additionally, leaf plants showed loss of turgidity and the crown area (area of plagiotropic distribution of the guides) got dehydrated.

Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010), did not perform pathogenic tests to determine whether *Pythium* sp. and two *Fusarium* species were the primary agents of the wilting plants. It is important to emphasize that it is more difficult to isolate *Phytophthora* sp. than some fungi, including *Fusarium* sp., due to some symptoms on aerial organs appear once the root infection has progressed. Under such conditions, secondary pathogens, or parasites and facultative saprophytes (fungi and bacteria) invade the root tissue masking *Phytophthora* sp. growth (Mircetich and Browne, 1987).

According to Erwin and Ribeiro (1996) keys, *Phytophthora* was isolated from 92 and 28 % of the tissue fragments with wilting symptoms cultured on PARPNH and V8-agar, respectively; *Fusarium* spp. (Barnett and Hunter, 2006) grew in 3 % of the tissue cultivated on V8-agar morphological. The morphological identification at the species level (Gallegly and Hong, 2008) and molecular analyses showed that the species correspond to *P. capsici*. These results, complemented with pathogenicity tests indicate that *P. capsici* is the primary causal agent of chayote wilting plants.

The symptoms observed in chayote plants naturally and artificially infected were growth reduction of root hairs, and watery brown lesions on primary roots and basal guides. It is possible that the brown lesions have been induced by pectolytic enzymes (PG and PME) that are produced by *P. capsici* during the infection process and that degrade the cell wall and the middle lamella of the vascular system parenchymal tissue (Li, *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011). Such degradation results in maceration and cell death due to osmotic changes, which is associated with plant wilting as there is no an efficient system of water movement, minerals, nutrients, hormones and other solutes.

Another factor that might be involved with wilting plants, is the physical obstruction of tracheal xylem elements due to hyphal growth and to the possible invasion of other fungi (*Fusarium* spp.), as it increases the formation of gels and gums that are induced by accumulation and oxidation of cell degradation products (Agrios, 2005; Arevalo *et al.*, 2012).

Some conditions of the crop such as production in sloped areas and cultural practices (nitrogen fertilization, weed control and removal of soil in the drip area with hoe) facilitate *P. capsici* dispersion and the risk of infection of roots with young wounds (Jung and Blaschke, 2004; Erwin and Ribeiro, 1996, Elliott, 1989). According to Duniway (1983), the high relative humidity is one of the most important environmental conditions that induces the development of the diseases caused by *Phytophthora* spp. The incidence of chayote wilting plants in the geographical sampling area is approximately 13 to 15 % in the highest

desarrollo de lesiones pardas de apariencia acuosa en las raíces primarias y guías basales. Es posible que las lesiones pardas se deban a la acción de enzimas pectolíticas (PG y PME) que produce *P. capsici* durante el proceso de infección y que degradan la pared celular y lamela media del tejido parenquimatoso del sistema vascular (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Tal degradación resulta en la maceración y muerte celular debido a cambios osmóticos, lo cual se asocia con el marchitamiento de la planta al no contar con un sistema eficiente en el movimiento de agua, sales minerales, nutrientes, hormonas y otros solutos.

Otro factor que pudiera estar involucrado con el marchitamiento de las plantas es la obstrucción física de los elementos traqueales del xilema debido al crecimiento de hifas y a la posible invasión de otros hongos (*Fusarium* spp.), ya que incrementa la formación de geles y gomas que se inducen por la acumulación y oxidación de los productos de degradación celular (Agrios, 2005; Arévalo *et al.*, 2012).

Algunas condiciones del cultivo tales como producción en áreas con pendiente y labores culturales (fertilización nitrogenada, control de malezas y remoción del suelo en la zona de goteo con azadón) facilitan la dispersión y el riesgo de infección por *P. capsici* en raíces con heridas recientes (Jung y Blaschke, 2004; Erwin y Ribeiro, 1996; Elliott, 1989). De acuerdo con Duniway (1983), la alta humedad relativa representa una de las condiciones ambientales de mayor importancia que induce el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* spp. La incidencia de plantas de chayote con síntomas de marchitez en el área geográfica de muestreo es aproximadamente del 13 al 15 % en la temporada de mayor precipitación pluvial y temperatura de 15 y 17 °C con humedad relativa del 100 %.

El decaimiento repentino de las plantas ocurre durante el patrón diurno de transpiración, y aun cuando algunas plantas se recuperan por la tarde, el marchitamiento vuelve a presentarse al día siguiente y las plantas mueren. La severidad del marchitamiento de las plantas varía de una huerta a otra, pero se considera proporcional al grado y velocidad de la infección de las raíces (Zitter *et al.*, 2004); sin embargo, debe considerarse que tanto la severidad como la incidencia de la enfermedad están en función de las condiciones ambientales y de la naturaleza genética del patógeno y la planta hospedante.

CONCLUSIÓN

Con base en las pruebas de patogenicidad y las identificaciones morfológica y molecular, se reporta por primera vez en México que *Phytophthora capsici* es el agente causal de la marchitez de plantas de chayote en la región centro del estado de Veracruz.

Agradecimientos. Agradecemos al Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM); a la Línea Prioritaria de Investigación 13: Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local, del Colegio de Postgraduados; y al CONACYT por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

rainfall season, 15-17 °C temperature and 100 % relative humidity.

The sudden plants decay occurs during the diurnal pattern of transpiration, and even though some plants recover in the afternoon, wilting recurs the next day and the plants die. The severity of the wilting plants disease varies from one planting to another, but is considered proportional to the extent and rate of root infection (Zitter *et al.*, 2004); however, it must be considered that both, the severity and incidence of the disease, depend on environmental conditions, and both the genetic nature of the pathogen and the host plant.

CONCLUSION

According to the pathogenicity test and the morphological, and molecular identification, it is reported for the first time in Mexico that *Phytophthora capsici* is the causal agent of chayote wilting plants in the central region of the state of Veracruz.

Acknowledgements. Thanks to the Interdisciplinary Research Group of *Sechium edule* in Mexico AC (GISeM); to the Priority Research Line 13: Agricultural Rural Communities, Communal lands and Local Knowledge, at Colegio de Postgraduados; and to CONACYT for the financial support to carry out this work.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. New York. USA. 922p.
- Arévalo GL, García OC y Rosas SGH. 2012. Factores que afectan la vida de florero en flores de corte. *Agroproductividad* 5: 28-35.
- Aung LH, Harris CM, Rij RE and Brown JW. 1996. Postharvest storage temperature and film wrap effects on quality of chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *J. Hort Science* 71: 297-304.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Bowers JH, Martin FN, Tooley PW and Luz EDMN. 2006. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97:492-503.
- Cadena IJ, Ruíz PLM, Trejo LC, Sánchez GP y Aguirre MJF. 2001. Intercambio de gases y relaciones hídricas del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7: 21-35.
- Cadena IJ, Ruíz PLM, Aguirre MJF y Sánchez GP. 2005. Estudio de los síntomas asociados a la pérdida de color del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) en Veracruz, México. *Revista Chapingo serie Horticultura* 11:309-316.
- Cadena IJ, Arévalo GL, Avendaño ACH, Soto HM, Ruiz PLM, Santiago OE, Acosta RM, Cisneros SVM, Aguirre MJF and Ochoa MD. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh*

- Produce 1: 41-53.
- Cadena IJ, Avendaño ACH, Arévalo GL, Cisneros SVM y Campos RE. 2010. El chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw., importante recurso fitogenético mesoamericano. *Agroproductividad* 3: 26-34.
- Café FAC and Ristaino JB. 2008. Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina. *Plant Disease* 92: 1439-1443.
- Duniway JM. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. Pages 175-187 *In: Erwin DC, Bartnicki GS, and Tsao PH. (eds.). Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 392p.*
- Elliott CG. 1989. Some aspects of nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. *Mycological Research* 92: 34-44.
- Erwin CD and Ribeiro KO. 1996. *Phytophthora*. Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 562p.
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. 2012. Listas de nombres comunes de fungicidas. www.frac.info (consulta, noviembre 2012).
- Gallely EM and Hong C. 2008. Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 158p.
- GISem. 2008. Rescatando los recursos fitogenéticos mesoamericanos. Volumen 1. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. Primera edición. 17p.
- GISem. 2011. Rescatando y aprovechando los recursos fitogenéticos de Mesoamérica. Volumen 2: Chayote. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 24p.
- Jackson KL, Yin J, Csinos AS and Ji P. 2010. Fungicidal activity of fluopicolide for suppression of *Phytophthora capsici* on squash. *Crop Protection* 29: 1421-1427.
- Jung T and Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197-208.
- Lamour KH and Hausbeck MK. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90: 396-400.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan. 369p.
- Li P, Feng B, Wang H, Tooley PW and Zhang, X. 2011. Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Microbiology* 151: 61-70.
- Mircetich SM and Browne GT. 1987. *Phytophthora* root and crown rot of deciduous fruit trees: Progress and problems in etiology, epidemiology and control. Commemorative Symposium: Challenges and opportunities in fruit production, protection and utilization research. N.E. Looney, Ed. Summerland, B.C. Canada. 111p.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2012. Gen Bank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (consulta, noviembre 2012).
- Olgún, H. G. 2010. Identificación y caracterización morfológica, cultural y molecular de hongos asociados a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 118p.
- Rivera G, Brenes F y Gamboa W. 1992. Hoja divulgativa sobre las principales enfermedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). El Cocoro, COOPECHAYOTE R. L. 2p.
- Silva RHV, Fernández PSP, Canul GC, Macías LBC y Ávila, QGD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 134-147.
- Soto EM y Gómez CM. 1994. Uso del suelo y vegetación en los climas cálido-húmedos de Veracruz. *In: Castillo CG, Mejía SMT (eds). Los Recursos Vegetales. Problemática Ambiental en el Estado de Veracruz, Gobierno del Estado de Veracruz, México. 131-147p.*
- Vázquez TV, Zulueta RR and Lara MC. 1992. Análisis de la flora de malezas del campo experimental "La Bandera" municipio de Actopan, Veracruz. *La Ciencia y el Hombre* 11: 78-79.
- Wang H, Li F and Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification and characterization of a new pectate lyase from *Phytophthora capsici* using two different methods. *BMC Biotechnology* 11: 32.
- White TJ, Lee BS and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ, White TJ (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, CA, U.S.A. 315-322p.*
- Zitter AT, Hopkins LD and Thomas EC. 2004. Compendium of Cucurbit Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 88p.

Aceites Esenciales y Extractos Acuosaos para el Manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*

Essential Oils and Aqueous Extracts for the *in vitro* Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*

Daniel Antonio Vásquez Covarrubias, Roberto Montes Belmont, Alfredo Jiménez Pérez e Hilda Elizabet Flores Moctezuma, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Apartado postal 24. Yauatepec, Morelos. Correspondencia: rbelmont@ipn.mx

(Recibido: Septiembre 09, 2013 Aceptado: Marzo 12, 2014)

Vásquez Covarrubias DA, Montes Belmont R, Jiménez Pérez A y Flores Moctezuma HE. 2013. Aceites esenciales y extractos acuosaos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 170-179.

Resumen. El uso de fungicidas sintéticos favorece la aparición de hongos fitopatógenos resistentes, por lo que se requieren nuevos productos para el manejo de enfermedades. Una alternativa son los aceites esenciales (AE) y extractos acuosaos (EA) de origen vegetal. En este trabajo se evaluaron distintas concentraciones de AE y EA de cinco especies de la familia Chenopodiaceae sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) y *F. solani*. Se encontró que existe una respuesta diferencial entre las razas 2 y 3 de FOL e incluso entre aislamientos de una misma raza. Los AE de *Chenopodium album* [0.3 %] y *C. ambrosioides* [2 %] inhibieron totalmente el crecimiento y esporulación en ambas especies de *Fusarium*. De los EA probados, el de *Beta vulgaris* ejerció la mayor reducción del crecimiento micelial (38 %) y esporulación (61 %). Los EA al 5 %, de las cinco especies evaluadas, mostraron una estimulación del 27 al 183 % en el crecimiento micelial en las cuatro cepas empleadas. Al 10 %, *Beta vulgaris*, *C. album*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* y *C. graveolens* redujeron entre 11 y 38 % el crecimiento de *F. solani* y FOL raza 2 (aislamiento Yauatepec) con respecto al testigo.

Palabras clave adicionales: Plantas antifúngicas, Chenopodiaceae, epazote, epazote de borrego, betabel.

En la familia Chenopodiaceae existen varias especies con metabolitos con un amplio espectro de acción contra hongos fitopatógenos dentro de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phyllachora*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Tilletia* (Grainge y Ahmed, 1988; Rodríguez, 2005). Estos

Abstract. The use of synthetic pesticides favors the appearance of resistant pathogens and pest; therefore, new products are needed for disease management. The use of essential oils (EO) and aqueous extracts (AE) are an alternative option. In this work, different concentrations of EO and AE of five Chenopodiaceae species were evaluated on micelial growth and spore production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) and *F. solani*. It was found that there is a differential response between races 2 and 3 of FOL and even among isolates of the same race. EO of *Chenopodium album* [0.3 %] and *C. ambrosioides* [2 %] inhibited micelial growth and spore production on both *Fusarium* species. Of the EA tested, *Beta vulgaris* exercised the greatest reduction in mycelial growth (38 %) and sporulation (61 %). The EA 5 %, of the five species tested showed a stimulation by 27 to 183 % in mycelial growth on the four strains used. At 10 %, *Beta vulgaris*, *C. album*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* and *C. graveolens* reduced between 11 and 38 % growth of *F. solani* and FOL race 2 (isolate Yauatepec) compared with the control.

Additional keywords: Antifungal plants, Chenopodiaceae, american wormseed, lamb's quarters, beet.

In the Chenopodiaceae family there are several species with metabolites with a broad spectrum of activity against fungal pathogens within the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phyllachora*, *Puccinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* and *Tilletia* (Grainge and Ahmed, 1988; Rodríguez, 2005). These metabolites are detected in aqueous, ethanolic and methanolic extracts and in essential oils.

Rafik *et al.* (1984) found that the *Chenopodium album* aqueous extract, inhibits development of *Cochliobolus carbonum* and *Glomerella tucumanensis*. Grainge and Ahmed (1988) in a literature review, reported the *Beta vulgaris* antifungal activity against *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia penniseti*, *Fusarium*

metabolitos se detectan en extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y aceites esenciales.

Rafiq *et al.*, (1984) encontraron que el extracto acuoso de *Chenopodium album* inhibe el desarrollo de *Cochliobolus carbonum* y de *Glomerella tucumanensis*. Grainge y Ahmed (1988) en una revisión de literatura, indican la propiedad antifúngica en *Beta vulgaris* contra *Alternaria tenuis*, *Aspergillus oryzae*, *Curvularia penniseti*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Helminthosporium* spp. y *Rhizopus nigricans*. También mencionan que *C. album* actúa sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Monilia fructicola*, en tanto que *C. ambrosioides* inhibe a 20 especies de hongos incluyendo a dermatofitos de humanos.

En trabajo de campo, Montes-Belmont y Martínez (1992) aumentaron la producción de calabacita *Cucurbita pepo* en un 38 % con aplicaciones de extracto acuoso de *C. album* en comparación con plantas no tratadas contra *Erysiphe cichoracearum*. Bravo-Luna *et al.* (1998) reportaron que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* a una dosis de 500 ppm y la esporulación a 10000 ppm. Las saponinas de *C. quinoa* inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* (Woldemichael y Wink, 2001). Montes-Belmont y Flores-Moctezuma (2001) en trabajo sobre el causante del ergot del sorgo *Claviceps africana* reportaron que el extracto acuoso de *C. ambrosioides* al 4 % y la mezcla de los extractos acuosos de *Sizygium aromaticum* (0.5 %) y *C. ambrosioides* (3.5 %) redujeron significativamente el crecimiento micelial *in vitro*. Sin embargo, en pruebas *in vivo*, los polvos, extractos acuosos y etanólicos de *C. ambrosioides* no redujeron el crecimiento de este hongo sobre semillas de sorgo. Los aceites esenciales de esta planta al 5 y 10 %, mostraron un efecto fungicida sobre *F. thapsinum*, pero afectaron significativamente el porcentaje de germinación y la altura en plantas de sorgo. El aceite esencial de las partes aéreas de *C. botrys* tuvo actividad fungicida contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Tzakou *et al.*, 2006). Kumar *et al.* (2007) probaron que el aceite esencial de *C. ambrosioides* (100 µg/mL) actúa contra *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bipolaris oryzae*, y *Pythium debaryanum*.

Marangon *et al.* (2008) evaluaron el efecto del aceite esencial de *C. ambrosioides*, contra *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* y *F. semitectum*, encontrando que a una concentración del 0.3% se inhibe completamente el crecimiento, y que al 0.1 % alcanza una reducción superior al 90 %. Estos autores determinaron que el (Z)-ascaridol y E-ascaridol le confieren la actividad antifúngica a *C. ambrosioides*.

Saïdana *et al.* (2008) identificaron los compuestos volátiles y evaluaron el efecto de los aceites esenciales de *Suaeda fructicosa* (Chenopodiaceae) y *Limonium echioides* (Plumbaginaceae) sobre *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. sin encontrar efecto antifúngico. Javaid y Amin (2009) probaron *Chenopodium*

oxysporum, *F. solani*, *Helminthosporium* spp. and *Rhizopus nigricans*. They also mentioned that *C. album* acts on *Colletotrichum lindemuthianum* and *Monilia fructicola*, while *C. ambrosioides* inhibits 20 species of fungi including human dermatophytes.

In the fieldwork, Montes-Belmont and Martinez (1992) increased the production of *Cucurbita pepo* squash by 38 % with application of *C. album* aqueous extracts, compared to untreated plants against *Erysiphe cichoracearum*. Bravo-Luna *et al.* (1998) reported that the *Chenopodium ambrosioides* essential oil inhibited the mycelial growth of *Fusarium moniliforme* at a 500 ppm dose and sporulation at 10,000 ppm. *C. quinoa* saponins inhibited *Candida albicans* growth (Woldemichael and Wink, 2001). In the report of Montes-Belmont and Flores-Moctezuma (2001) about the causing agent of sorghum ergot (*Claviceps Africana*), they observed that the 4% *C. ambrosioides* aqueous extract and the mixture of the *Sizygium aromaticum* (0.5%) aqueous extracts and *C. ambrosioides* (3.5%), significantly reduced the *in vitro* mycelial growth. However, in *in vivo* tests, the powders, aqueous and ethanolic extracts of *C. ambrosioides* did not reduced the growth of this fungus in sorghum seeds. The 5 and 10 % essential oils of this plant showed a fungicidal effect on *F. thapsinum* but they significantly affected the germination percentage and plant height in sorghum. The essential oil of the *C. botrys* aerial parts had fungicidal activity against *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (Tzakou *et al.*, 2006). Kumar *et al.* (2007) proved that the *C. ambrosioides* essential oil (100 µg/mL) acts against *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bipolaris oryzae* and *Pythium debaryanum*.

Marangon *et al.* (2008) evaluated the effect of the *C. ambrosioides* essential oil against *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum*, and observed that at a 0.3% concentration, the growth was completely inhibited, and at 0.1 % over 90 % was reduced. These authors found that (Z)-ascaridole and (E)-ascaridole confer antifungal activity to *C. ambrosioides*.

Saïdana *et al.* (2008) identified the volatile compounds and they evaluated the effect of *Suaeda fructicosa* (Chenopodiaceae) and *Limonium echioides* (Plumbaginaceae) essential oils on *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. and *Alternaria* spp. without observing any antifungal effect. Javaid and Amin (2009) tested *Chenopodium album*, *C. murale* and *C. ambrosioides* against *Macrophomina phaseolina*, being *C. album* the best species in methanolic extract. Garduño-Pizaña *et al.* (2010) evaluated the effect of 15 plant species against *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, finding that the *C. ambrosioides* (5%) aqueous extract, significantly stimulated the growth and sporulation of the fungus, although it significantly reduced the germination of the conidia.

Recently, Rauf and Javaid (2013) tested different concentrations of methanolic extracts from leaves, stems, roots and inflorescences of *Chenopodium album* against

album, *C. murale* y *C. ambrosioides* contra *Macrophomina phaseolina*, siendo la mejor especie *C. album* en extracto metanólico. Garduño-Pizaña *et al.* (2010) evaluaron el efecto de 15 especies de plantas contra *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, encontrando que el extracto acuoso (5 %) de *C. ambrosioides* estimuló significativamente el crecimiento y esporulación del hongo y redujo significativamente la germinación de los conidios.

Recientemente, Rauf y Javaid (2013) probaron diferentes concentraciones de extractos metanólicos de hojas, tallos, raíces e inflorescencias de *Chenopodium album* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* encontrando el mayor efecto en las inflorescencias.

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad biológica de aceites esenciales (AE) y extractos acuosos (EA) de *Chenopodium album*, *C. graveolens*, *C. berlandieri* subsp., *nuttalliae*, *C. ambrosioides* y *Beta vulgaris*, sobre el crecimiento micelial y producción de micro y macroconidios en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*.

Especies de *Fusarium*. Tanto *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* como *F. solani* se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (México). Del primero se manejaron dos cepas de la raza 2 (una de Cuautla 2RC y otra de Yautepec, Morelos 2RY) y una de la raza 3 3R proveniente de Emiliano Zapata en el mismo estado. La cepa de *F. solani* provino de Tepoztlán, Morelos. Todas las cepas provenían de plantas de jitomate y fueron identificadas morfológica y molecularmente (Domínguez, 2012). Las cepas se mantuvieron en cajas de Petri de 15 x 90 mm con medio papa-dextrosa-agar (PDA, BDBioxon®). La temperatura se mantuvo en 25 ± 3 °C durante el transcurso de los bioensayos.

Especies vegetales. Se utilizaron tres especies con antecedentes de propiedades antifúngicas: betabel (*Beta vulgaris*), epazote común (*Chenopodium ambrosioides*) y epazote de borrego (*C. album*). Una con efecto contra hormigas (epazote de zorrillo *C. graveolens*) (Grainge y Ahmed, 1988) y otra con propiedades alimenticias huauzontle (*C. berlandieri* subsp. *Nuttalliae*). Estas plantas se obtuvieron por colectas de campo en Jumiltepec, Morelos (epazote de borrego), Juchitepec, Edo. de México (epazote de zorrillo) y en la central de abastos de Cuautla, Morelos (epazote común, huauzontle y betabel).

Procesamiento de las plantas. Se establecieron dos tipos de bioensayos uno para AE y otro para EA. Los AE se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor de acuerdo al protocolo descrito por Marangon *et al.* (2008). Para esto, 4 L de material de la planta picada se introdujeron en un matraz de bola de 12 L y se sometió a ebullición; el vapor de agua se pasó a través de un condensador hasta que la destilación se detuvo y el destilado presentaba capa aceitosa. El destilado (hidrosol y AE) se congeló por un día con el propósito de congelar la fase acuosa (hidrosol) y facilitar la colecta del AE por decantación. Al hidrosol se le adicionó éter (Baker®) en una proporción 1:10 (éter: hidrosol), se agitó por 30 seg y se congeló nuevamente para

Fusarium oxysporum f. sp. *cepae* finding the highest effect on the inflorescences.

Based on these reports, the aim of this study was to determine the biological activity of essential oils (EOs) and aqueous extracts (AEs) of *Chenopodium album*, *C. graveolens*, *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae*, *C. ambrosioides* and *Beta vulgaris*, on mycelial growth and production of micro and macroconidia in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*.

***Fusarium* species.** Both *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani* were obtained from the collection of the Plant Pathology Laboratory of the Center for Development of Biotic Products of the Instituto Politecnico Nacional (Mexico). From the first one, two strains of the race 2 (one from Cuautla 2RC and the other from Yautepec, Morelos 2RY) and one from the race 3 3R from Emiliano Zapata, Morelos state, Mexico. The *F. solani* strain was from Tepoztlan, Morelos. All strains were from tomato plants and they were morphologically and molecularly identified (Dominguez, 2012). Strains were kept in Petri dishes of 15 x 90 mm with potato-dextrose-agar (PDA, BDBioxon®). Temperature was kept at 25 ± 3 °C during the bioassays.

Plant species. Three species with a history of antifungal properties were used: Beet (*Beta vulgaris*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*) and lamb's quarters (*C. album*); another one effective against ants (fetid goosefoot, *C. graveolens*) (Grainge and Ahmed, 1988) and the last one with nutritional properties (huauzontle, *C. berlandieri* subsp. *Nuttalliae*). These plants were obtained by field collection in Jumiltepec, Morelos (*lamb's quarters*), Juchitepec, Mexico state (fetid goosefoot) and central de abastos market in Cuautla, Morelos (epazote, huauzontle and beets).

Plants processing. Two types of bioassays were established, one for Eos and another one for AEs. The EOs were obtained by steam distillation according to the protocol described by Marangon *et al.* (2008). Thus, 4 L of the chopped plant material were introduced into a 12 L round-bottomed flask until boiling; then water vapor passed through a condenser until distillation stopped and the distilled showed an oily layer. The distillate (hydrosol and EOs) was frozen for a day in order to freeze the aqueous phase (hydrosol) and facilitate the EOs collection by decantation. Ether (Baker®) was added to hydrosol in a 1:10 ratio (ether:hydrosol), stirred for 30 sec and frozen again in order to be able to separate the ether layer that contained EOs traces. Ether was removed in a water bath at a temperature between 35 and 45 °C. The EOs separated by freezing and with ether was mixed and dried by adding anhydrous sodium sulfate (Sigma®). EO was decanted and stored in amber flasks under refrigeration at 4 °C until use.

In order to obtain the AEs, the Montes-Belmont *et al.* (2000) protocol was followed. The previously ground material was placed in trays and dried in an oven between 45 and 55 °C (except for beets, which were cut into 3-5 mm slices and dried with a conventional fan during four days). Once plant material was dried, it was crushed with an electric mill to a mesh size No. 40. This fine powder was stored in plastic containers protected from light, in a cool

separar la fase etérea, la cual contenía trazas de AE. El éter se removió en baño maría a una temperatura entre 35 y 45 °C. El AE separado por congelación y por arrastre con éter se mezcló y secó adicionando sulfato de sodio anhidro (Sigma ®). El AE se separó por decantación y se almacenó en frascos ámbar en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para obtener EA se siguió el protocolo señalado por Montes-Belmont et al. (2000) el material previamente triturado se colocó en charolas y se secó en una estufa entre 45 y 55 °C; a excepción del betabel, el cual se partió en rebanadas de 3-5 mm y se secó con un ventilador convencional durante cuatro días. Una vez deshidratado el material vegetal, se procedió a triturarlo en un molino eléctrico a un tamaño de malla No. 40. Este polvo fino se almacenó en recipientes de plástico protegidos de la luz, en un lugar fresco (20 ± 3 °C) y seco hasta su uso.

Los EA se prepararon con agua destilada estéril, adicionando el polvo vegetal requerido para cada concentración [5, 10 ó 15 % p/v]. Cada matraz se colocó en agitación constante a 150 rpm durante 24 h. Pasado ese tiempo, se dejó reposar por 1 h y se filtró dos veces a través de gasas estériles. Inmediatamente después de filtrar cada EA, estos se incorporaron al medio de cultivo.

Los AE se incorporaron al medio de cultivo (PDA) después del proceso de esterilización del medio (15 lb/in durante 15 min) y hasta que el medio alcanzó una temperatura menor a 50 °C. Las concentraciones de AE empleadas fueron: 0.1, 0.3, 2 y 10 % v/v. Para facilitar la homogeneización de los AE en el medio, se agregó Tween 20 al 0.1 % en una proporción 1:5 (Tween:AE). Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar que incluyeron las 4 concentraciones y dos testigos: el control (únicamente PDA) y Tween 20 (proporción 1:5 respecto al AE). En todos los tratamientos se utilizaron seis repeticiones, considerando cada caja de Petri (90 x15 mm) como una unidad experimental. La temperatura de incubación fue a 25 ± 3 °C.

Con los EA, previamente filtrados, se preparó el medio de cultivo PDA, empleando al extracto acuoso como la cantidad de agua requerida para la preparación del medio, según instrucciones del fabricante, en condiciones normales. Es decir, si el medio requería 1,000 mL de agua, en su lugar se empleó 1000 mL de EA. Las concentraciones de EA empleadas fueron 5, 10 y 15 % (p/v). Una vez preparados los medios de cultivo, éstos se esterilizaron a 15 lb/in durante 15 min. El diseño experimental fue el mismo que para AE, además se incorporó un control (únicamente PDA).

Variables a medir:

a) Crecimiento micelial. El borde del micelio se marcó con un plumón indeleble cada 24 h después de la inoculación, hasta que el micelio del control (en al menos cuatro repeticiones) alcanzara el borde de la caja. Para determinar el área micelial se tomó una fotografía con una cámara digital fija en un tripie, manteniendo siempre las mismas condiciones (distancia, zoom, calidad en MPx y formato de imagen). En el programa ImageJ se calibró una distancia conocida para obtener la relación pixeles:mm. Una vez obtenida esta proporción, en Adobe Photoshop

(20 ± 3 °C) and dry place until use.

AEs were prepared with sterile distilled water, adding the plant powder required for each concentration [5, 10 or 15 % w/v]. Each flask was placed under constant stirring at 150 rpm for 24 h. After that time, they were allowed to stand for 1 h and filtered twice through sterile gauze pads. Immediately after filtering each AE, these were added to the culture medium.

EOs were added to culture media (PDA) after the sterilization process of the medium (15 lb/in for 15 min) and until the medium reached a temperature below 50 °C. The EOs concentrations used were: 0.1, 0.3, 2 and 10 % v/v. In order to facilitate the homogenization of the EOs in the medium, 0.1 % Tween 20 was added in a ratio 1:5 (Tween:EO). The treatments were established in a completely randomized design involving 4 concentrations and two controls: control (only PDA) and Tween 20 (1:5 ratio relative to EOs). In all treatments six replicates were done, considering each Petri dish (90 x15 mm) as an experimental unit. The incubation temperature was 25 ± 3 °C.

With the previously filtered AEs, the PDA culture media was prepared using the aqueous extract as the amount of water required for the media preparation, according to the manufacturer's instructions, under normal conditions. That is, if the media required 1,000 mL of water, then 1,000 mL of the AEs were used. The AEs concentrations used were 5, 10 and 15% (w/v). Once culture media were prepared, they were sterilized at 15 lb/in for 15 min. The experimental design was the same as for EOs, plus a control (only PDA).

Variables to be measured:

a) Mycelial growth. Mycelium border was marked with permanent marker every 24 h after inoculation, until control mycelia (in at least four repeats) reach the edge of the box. In order to determine the mycelial area, a picture was taken with a fixed digital camera (on a tripod), maintaining always the same conditions (distance, zoom, MPx quality and image format). With ImageJ software, a known distance was calibrated in order to obtain the pixels: mm ratio. Once this proportion was obtained, the "magnetic lasso" tool (Adobe Photoshop CS5®) was used to identify and measure the mycelial area expressed as mm².

Once all photographs (one per petri dish) were obtained, they were selected and exported to a txt document tab-delimited, which then was open in Excel and saved as spreadsheet in order to obtain the percentage of growth inhibition with respect to the control (% GIC) using the following formula:

$$\% \text{ G.I.C.} = \frac{AMC - AMT}{AMC} * 100$$

Where CMA = control mycelial area and TMA = treatment mycelial area.

b) Production of micro-and macroconidia. Once the photography necessary to calculate the % GIC was obtained, a mycelial scraping with a sterile glass rod was done to each Petri dish. Then 15 mL of sterile distilled water were added and poured into a sterile beaker. The same

CS5®, se empleo la herramienta “lazo magnético” para señalar y medir el área micelial expresada como mm².

Una vez tomadas las medidas de todas las fotografías (una por caja de Petri), se seleccionaron y exportaron a un documento txt delimitado por tabuladores, el cual se abrió en Excel y se guardó como hoja de cálculo para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control (% I.C.R.C.) mediante la fórmula:

$$\% \text{ I.C.R.C.} = \frac{AMC - AMT}{AMC} * 100$$

donde AMC= área micelial del control y AMT= área micelial del tratamiento.

b) Producción de micro y macroconidios. A cada caja de Petri se le realizó un raspado micelial con una varilla de vidrio estéril. Se adicionaron 15 mL de agua destilada estéril y se vació en un vaso de precipitado estéril. El mismo procedimiento se realizó en cada tratamiento y al final se obtuvo una suspensión de esporas por tratamiento, a partir de la cual se realizaron tres conteos por repetición en una cámara de Neubauer marca Marienfeld® (Alemania). La determinación del número de esporas se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. esporas/mL} = \frac{\text{No. esporas contadas}}{\text{No. cuadrantes contados}} \times \frac{\text{No. cuadrantes de la cámara}}{\text{volumen de la cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Se calculó el porcentaje de inhibición de la esporulación (% I.E.), de la siguiente manera:

$$\% \text{ I.E.} = \frac{\text{No. de esporas del control/mL} - \text{No. esporas del tratamiento/mL}}{\text{No. esporas del control/mL}} * 100$$

Ambos bioensayos fueron repetidos en dos ocasiones para confirmar los resultados. Los datos de las dos repeticiones fueron sometidos a ANOVA seguido de separación de medias por Holm-Sidak. El análisis se llevó a cabo en el programa Sigma-Plot versión 10.0 y la probabilidad de rechazo fue de 5 %.

RESULTADOS

Crecimiento micelial. El AE de betabel al 0.3 % tuvo efecto fungistático con reducción significativa del crecimiento micelial de la cepa R2Y en un 71.12 %. Huauzontle y epazote de zorrillo, al 10 %, redujeron significativamente el crecimiento micelial de la cepa R3 (76.72 y 77 % respectivamente). Los AE de epazote de borrego y epazote común impidieron totalmente el crecimiento micelial de ambas especies *Fusarium* y las dos razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* desde la inoculación del patógeno hasta la última lectura de crecimiento (11 d) (Figura 1A).

Los cinco EA presentaron un efecto fungistático en el crecimiento micelial. La reducción máxima de crecimiento micelial (I.C.R.C.) para cada especie fue; huauzontle 10 %, epazote común 23 %, epazote de zorrillo 24 %,

procedure was done for each treatment and a spore suspension was obtained for each of them, from which three counts per repetition were done in a Neubauer chamber (Marienfeld®, Germany). Quantification of spores was done using the following formula:

$$\text{Spores \#/mL} = \frac{\text{Counted spores \#}}{\text{Counted quadrants \#}} \times \frac{\text{Chamber quadrants \#}}{\text{chamber volume}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Inhibition of sporulation percentage (% IS) was calculated as follows:

$$\% \text{ I.S.} = \frac{\text{Control spores \#/mL} - \text{Treatment spores \#/mL}}{\text{Control spores \#/mL}} * 100$$

Both bioassays were repeated twice to confirm the results. Data of the two repetitions were subjected to ANOVA followed by separation of Holm-Sidak means. The analysis was performed in Sigma-Plot version 10.0 and the probability of rejection was 5 %.

RESULTS

Mycelial growth. The 0.3% beet's EOs showed fungistatic effect with significant reduction of mycelial growth of the R2Y strain down to 71.12%. The 10% Huauzontle and 10 % fetid goosefoot, significantly reduced the mycelial growth of R3 strain (76.72 and 77% respectively). The *lamb's quarters* and common epazote EOs completely prevented the mycelial growth of both *Fusarium* species and two *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains from pathogen inoculation until the last growth reading (11 d) (Figure 1A).

The five AEs showed a fungistatic effect on mycelial growth. The maximum reduction in mycelial growth (G.I.C) for each species was: huauzontle 10 %, epazote 23 %, fetid goosefoot 24 %, *lamb's quarters* 28 % and beet 38 % (Figure 1B).

Microconidia production. The beet (0.3%) and huauzontle (10%) EOs decreased by 74 and 52 % (respectively) the number of microconidia in the R3 FOL strain. The *lamb's quarters* and epazote (2% and 0.3% respectively) EOs decreased by 100% mycelial development and microconidia and macroconidia production (Figure 2A).

Only the 5% AEs reduced the microconidia production. *Lamb's quarters* 8% on R2C; epazote 37% on FS; fetid goosefoot 46% on R2Y; epazote, 51% for huauzontle on R2Y and 61% for beet on R2Y (Figure 2B).

Macroconidia production. The huauzontle and beets (0.3 %) EOs, reduced 87% macroconidia production of FOL R2Y. The fetid goosefoot EO, did not show difference with respect to the control, in the macroconidia number (Figure 3A).

Only the 5% AEs reduced the macroconidia production with respect to the control. The lowest reduction was that of beets against FS and R2Y (64% G.I.C.); while the maximum reduction was *lamb's quarters* on FS (90 % G.I.C) (Figure 3B).

DISCUSSION

Although Grainge and Ahmed (1988) had already

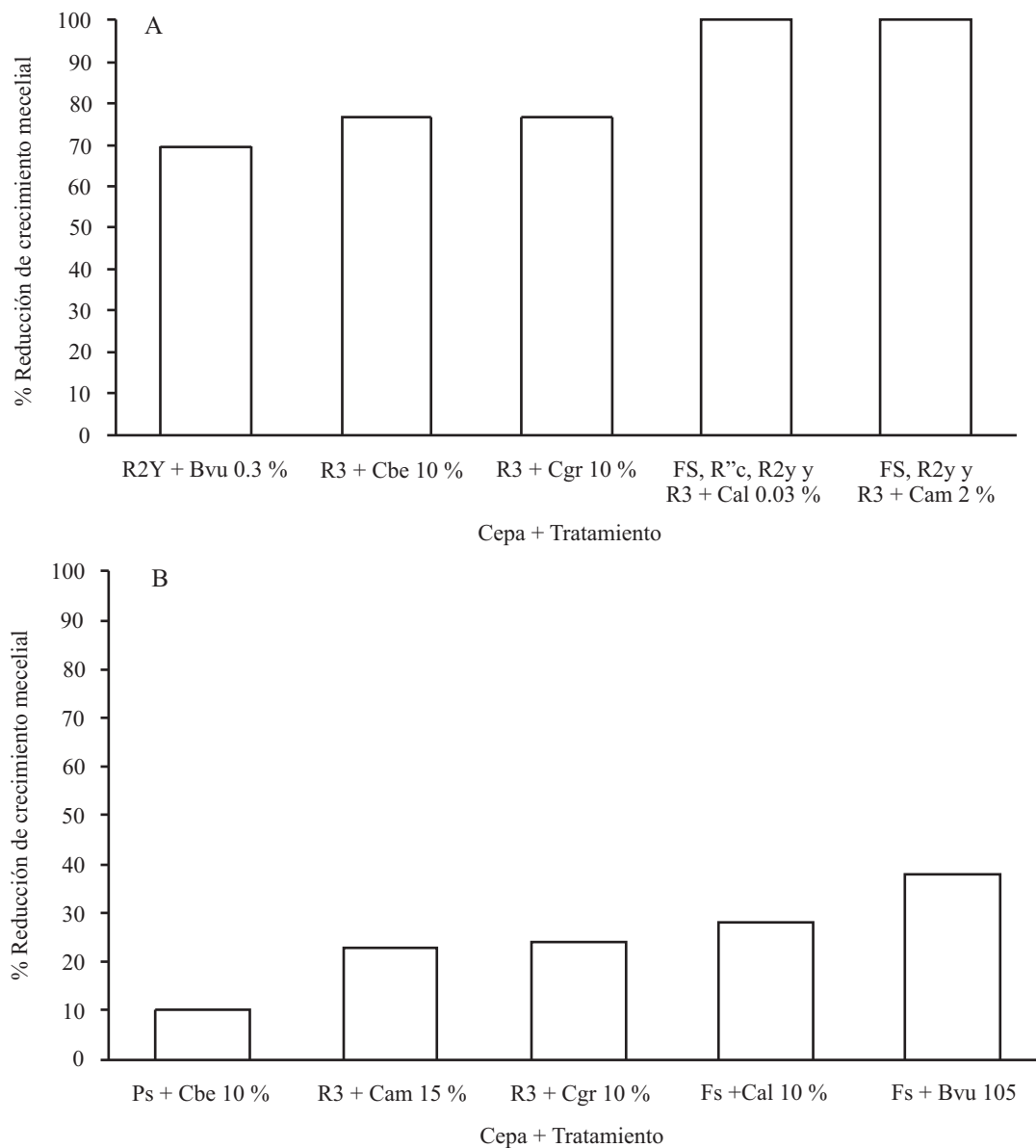


Figura 1. Reducción del crecimiento micelial con respecto al control de *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B) de Bvu.= *Beta vulgaris*, Cal = *Chenopodium album*, Cam = *C. ambrosioides*, Cbe = *C. berlandieri* subsp. *nutalliae* y Cgr = *C. graveolens*. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak, $p < 0.05$). FS= *F. solani*, R2Y= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (Yautepec), R2C= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 (Cuautla) y R3= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. (Cuautla) y R3= *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

epazote de borrego 28% y betabel 38% (Figura 1B).

Producción de microconidios. Los AE de betabel (0.3 %) y AE de huauzontle (10 %) redujeron un 74 y 52 % (respectivamente) el número de microconidios en la cepa FOL R3. Los AE de epazote de borrego y epazote común (al 2 % y 0.3 % respectivamente) redujeron en 100 % el desarrollo micelial, y la producción de microconidios y macroconidios (Figura 2A).

reported the *B. vulgaris* and *C. ambrosioides* antifungal effect on *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, they did not compare the susceptibility between species and isolates of these two pathogens to the same essential oil or aqueous extract.

Differences in susceptibility (mycelial growth and conidial production) between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani* were found; there was also a

Únicamente los EA al 5 % redujeron la producción de microconidios. 8 % para epazote de borrego sobre R2C; 37 % para epazote común sobre FS, 46 % para epazote de zorrillo sobre R2Y, 51 % para huauzontle sobre R2Y y 61 % para betabel sobre R2Y (Figura 2B).

differential response between FOL races 2 and 3 and even among isolates of the same race. This is consistent with the diversity of responses found by other authors from a stimulus in the growth of *C. ambroioides* on *F. o. f. sp. gladioli* (Garduño-Pizaña *et al.*, 2010) till total inhibition of

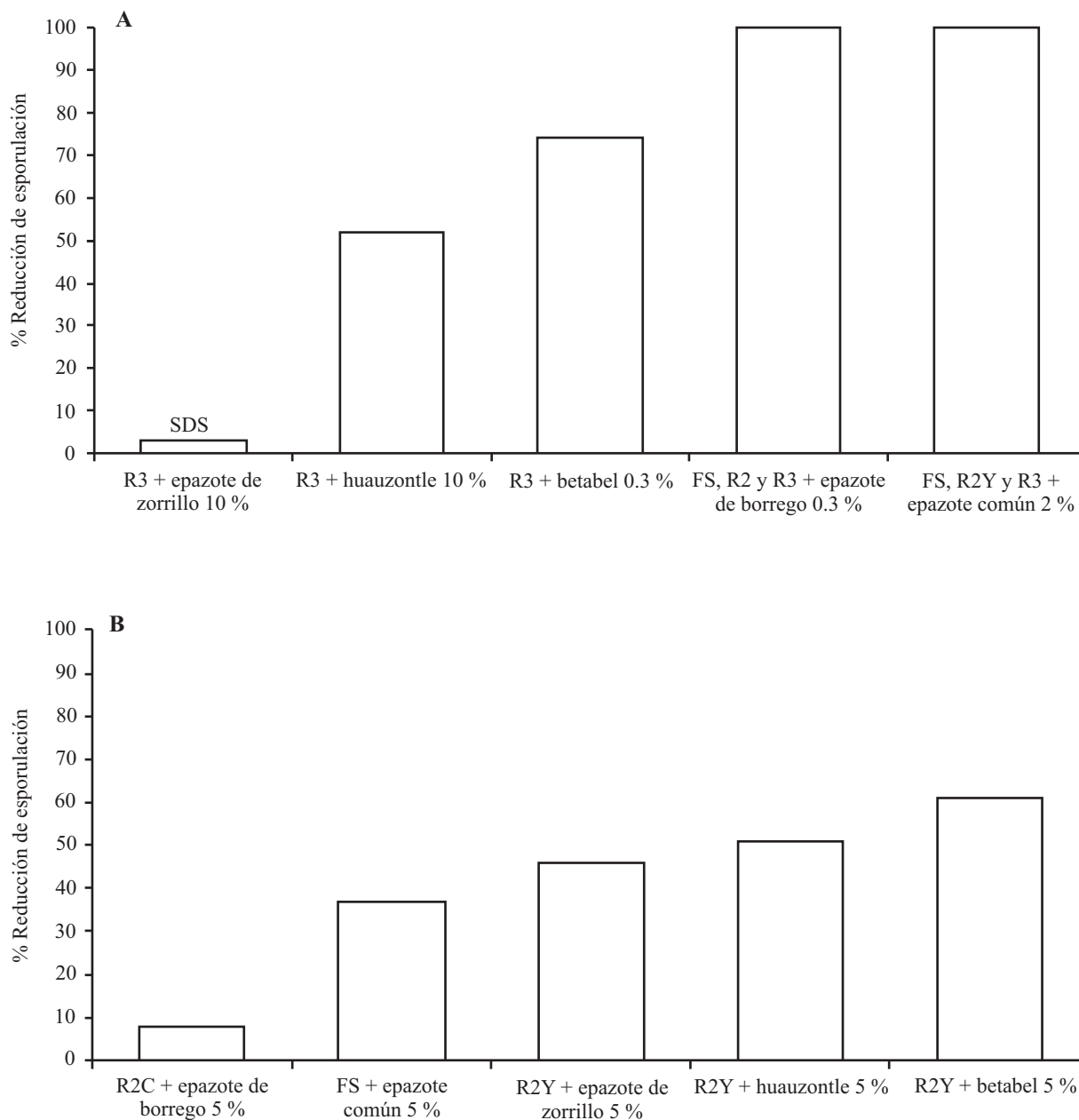


Figura 2. Porcentaje de reducción en la producción de microconidios en *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B). Todos los tratamientos, excepto el marcado con SDS presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak, $p < 0.05$). $n = 6$. FS, *F. solani*; R2Y, FOL raza 2 (Yautepec); R2C, FOL raza 2 (Cuautla) y R3, FOL raza 3.

Figure 2. Percentage of reduction in the microconidia production in *Fusarium* spp. with essential oils (A) and aqueous extracts (B). All treatments, except the SDS labeled, showed significant difference from control (Holm-Sidak, $p < 0.05$). $n = 6$. FS, *F. solani*; R2Y, FOL race 2 (Yautepec); R2C, FOL race 2 (Cuautla) and R3, FOL race 3.

Producción de macroconidios. Los AE de huauzontle y betabel (al 0.3 %) redujeron 87 % la producción de macroconidios de FOL R2Y. El AE de epazote de zorrillo no mostró diferencias, con respecto al control, en el número de macroconidios (Figura 3A).

Únicamente los EA al 5 % redujeron la producción de macroconidios con respecto al control. La menor reducción se encontró con betabel contra FS y R2Y (64 % I.C.R.C.); mientras que la máxima reducción se registró con epazote de borrego sobre FS (90 % I.C.R.C.) (Figura 3B).

F. o. f. sp. cepae by *C. album* (Rauf and Javaid, 2013).

For *C. album*, this is the first report of its effect on *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3. It is reported also for the first time the biological activity of EOs and AEs of *C. album*, *C. graveolens* and *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* on mycelial growth and conidial production of *Fusarium* species.

Even when *C. album* and *C. ambrosioides* EOs cause reduction, growth and sporulation inhibition of the tested species, their chemical composition is different (Duke,

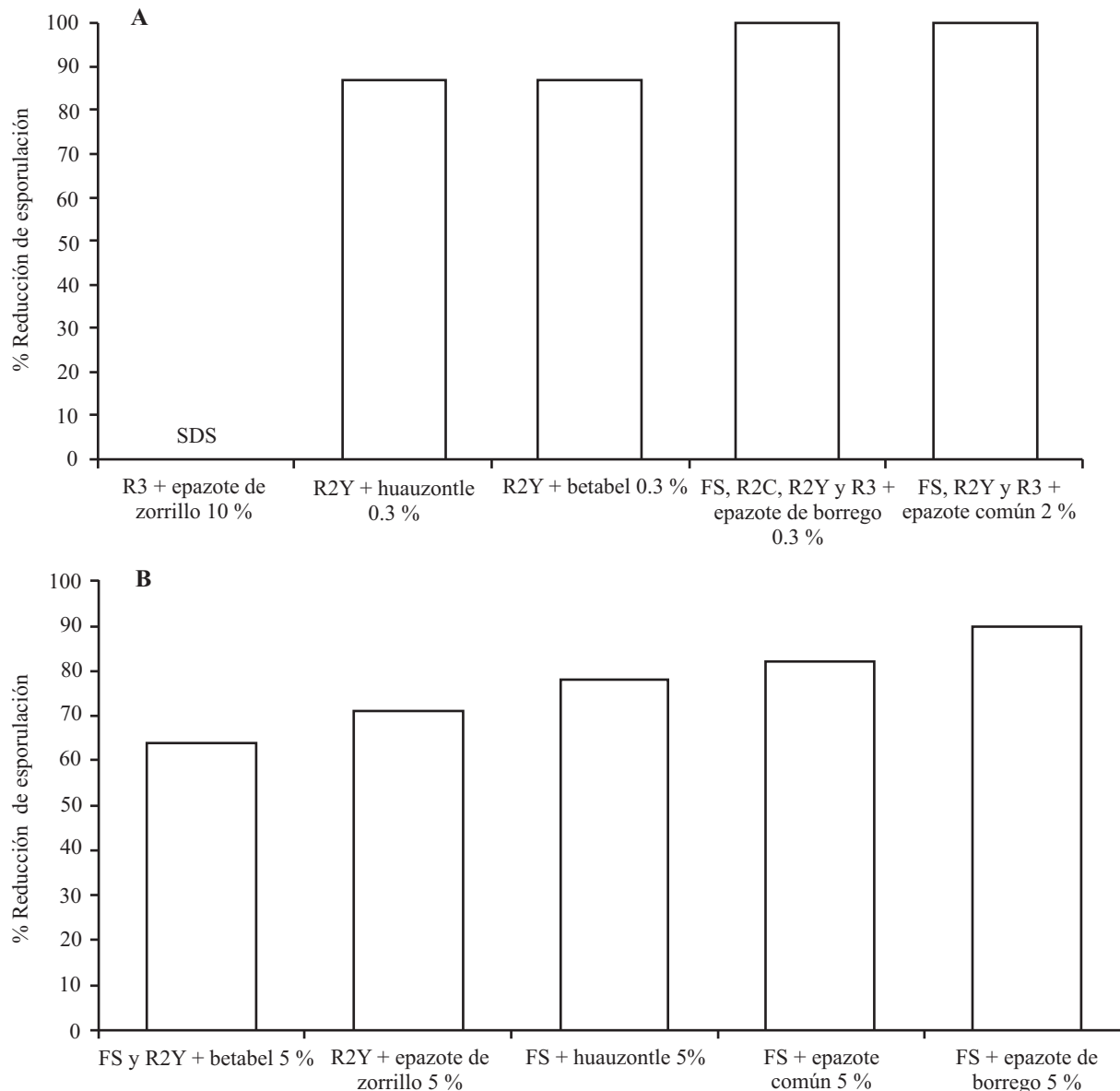


Figura 3. Porcentaje de reducción en la producción de macroconidios en *Fusarium* spp. con aceites esenciales (A) y extractos acuosos (B). Todos los tratamientos, excepto el marcado con SDS presentaron diferencia significativa respecto al control (Holm-Sidak, $p < 0.05$) $n = 6$. FS, *F. solani*; R2Y, FOL raza 2 (Yautepec); R2C, FOL raza 2 (Cuautla) y R3, FOL raza 3.

Figure 3. Percentage of reduction in the macroconidia production in *Fusarium* spp. with essential oils (A) and aqueous extracts (B). All treatments, except the SDS labeled, showed significant difference from control (Holm-Sidak, $p < 0.05$) $n = 6$. FS, *F. solani*; R2Y, FOL race 2 (Yautepec); R2C, FOL race 2 (Cuautla) and R3, FOL race 3.

DISCUSIÓN

Aunque ya se había reportado el efecto antifúngico de *B. vulgaris* y *C. ambrosioides* sobre *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Grainge y Ahmed 1988) no se había comparado la susceptibilidad entre especies y aislamientos de estos dos patógenos ante un mismo aceite esencial o extracto acuoso.

Se encontraron diferencias en la susceptibilidad (crecimiento micelial y producción de conidios) entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*; también hubo una respuesta diferencial entre las razas 2 y 3 de FOL e incluso entre aislamientos de una misma raza. Esto concuerda con la diversidad de respuestas encontrada por otros autores desde un estímulo en el crecimiento de *C. ambrosioides* sobre *F. o. f. sp. gladioli* (Garduño-Pizaña *et al.*, 2010) hasta inhibición total de *F. o. f. sp. cepae* por parte de *C. album* (Raufy y Javaid, 2013).

En el caso de *C. album*, este es el primer reporte de este efecto sobre *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 2 y 3. También se reporta por primera vez la actividad biológica de AE y EA de *C. album*, *C. graveolens* y *C. berlandieri* subsp. *nuttalliae* sobre el crecimiento micelial y producción de conidios de especies de *Fusarium*.

Aún cuando los AE de *C. album* y *C. ambrosioides* causan la reducción e inhibición del crecimiento y esporulación de las especies probadas, su composición química es diferente (Duke, 2008). Esta diferencia en la composición, así como diferencias en la concentración de los compuestos, podrían explicar el por qué los AE y EA de ambas especies provocan respuestas diferentes en *Fusarium* spp.

Bravo-Luna *et al.* (1998) y Kumar *et al.* (2007) mencionan que la susceptibilidad del patógeno a extractos vegetales será distinta según la especie, forma específica, raza y patogenicidad del hongo. Asimismo, esta susceptibilidad será distinta según la concentración del tratamiento a la que se someta al organismo.

Esta respuesta diferencial puede atribuirse a mecanismos de resistencia (enzimáticos, estructurales, cambio de la permeabilidad de la membrana, etc.) que le permitan aprovechar, evitar o detoxificar alguno de los compuestos presentes en los extractos vegetales (Vivanco *et al.*, 2005).

Otros compuestos, tales como ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, formaldehído, kaempferol, ácido p-cumárico, quercetina, entre otros, presentes en *B. vulgaris*, *C. ambrosioides* y *C. album* (Duke 2008) se han reportado también como fungicidas y/o fungistáticos, por lo que es difícil atribuir el efecto antifúngico a algún compuesto, sin pruebas específicas.

Los EA al 10 y 15 % redujeron significativamente el crecimiento micelial, pero estimularon la producción de esporas; caso contrario con EA al 5 %, donde estimularon el crecimiento micelial pero redujeron la producción de conidios.

La producción de estructuras de reproducción significa un gasto energético importante para el organismo, sin embargo, estas estructuras tienen un papel importante en el ciclo de vida del organismo. Su fabricación requiere del

2008). This difference in composition, as well as differences in concentration of the compounds, could explain why the EOs and AEs of both species cause different responses in *Fusarium* spp.

Bravo-Luna *et al.* (1998) and Kumar *et al.* (2007) reported that the susceptibility of the pathogen to plant extracts is different depending on the species, specifically, to fungus race and pathogenicity. Also, this susceptibility is different depending on the concentration of the treatment used to treat the organism.

This differential response may be attributed to resistance mechanisms (enzymatic, structural, change of the membrane permeability, etc.) that allow them to use, prevent or detoxify some of the compounds present in plant extracts (Vivanco *et al.*, 2005).

Other compounds, such as caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, formaldehyde, kaempferol, p-coumaric acid, quercetin, among others, present in *B. vulgaris*, *C. ambrosioides* and *C. album* (Duke, 2008), have been also reported as fungicidal and/or fungistatics, so it is difficult to attribute the antifungal effect to some compound, without specific tests.

The 10% and 15% AEs significantly reduced mycelial growth, but stimulated spore production; contrary to the 5% AE that stimulated the mycelial growth but reduced the conidia production.

The production of reproduction structures represents a significant energy consumption to the body, however, these structures have an important role in the life cycle of the organism. Their formation requires storage, synthesis or transformation of essential compounds to achieve the formation of functional conidia (Ramachandran *et al.*, 2008). Mainly for *Fusarium*, it is well known that its conidia contain high amounts of fatty compounds that require a carbon and nitrogen rich-substrate for germination (Palmero *et al.*, 2008). Based on the energy and nutritional requirements of the fungus for the formation of micro and macroconidia, it can be proposed that EOs provide carbon and nitrogen rich compounds and that the fungus is able to assimilate and use them in the conidia production (Garduño-Pizaña, 2010).

Essential oils (0.3-2%) of *C. album* and *C. ambrosioides* showed antifungal activity against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3, as they caused significant reduction in the mycelial growth and conidia production, proving to be the most efficient antifungal treatments against all four strains tested.

Acknowledgments. Thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and to the Instituto Politécnico Nacional for the financial support provided for the realization of this work. To Guillermo Fuentes Dávila, PhD and Luis Pérez Moreno, PhD, for the revision of this work.

LITERATURA CITADA

Bravo-Luna L, Bermudez-Torres K y Montes-Belmont R. 1998. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium moniliforme* Sheld. mediante aceites esenciales vegetales y algunos de sus componentes

almacenamiento, síntesis o transformación de compuestos esenciales para lograr la formación de conidios funcionales (Ramachandran *et al.*, 2008). Particularmente para *Fusarium*, se sabe que sus conidios poseen altas cantidades de compuestos grasos y que requieren de un sustrato rico en carbono y nitrógeno para la germinación (Palmero *et al.*, 2008). Basado en los requerimientos energéticos y nutricionales del hongo para la formación de micro y macroconidios, se puede proponer que los EA proporcionan compuestos ricos en carbono y nitrógeno y que el hongo es capaz de asimilarlos y aprovecharlo para su beneficio en la producción de conidios (Garduño-Pizaña, 2010).

Los aceites esenciales (0.3 - 2 %) de *C. album* y *C. ambrosioides* mostraron ser antifúngicos para *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 2 y 3, ya que causaron reducción significativa del crecimiento micelial y producción de conidios, resultando ser los tratamientos con mayor actividad antifúngica frente a las cuatro cepas evaluadas.

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico brindado para la realización del presente trabajo. A los doctores Guillermo Fuentes Dávila y Luis Pérez Moreno por la revisión del presente trabajo.

- químicos. Revista Mexicana de Fitopatología 16: 18-23.
- Dominguez, A. G. 2012. Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. En jitomate cultivado en suelo bajo invernadero en Morelos, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. 107 p.
- Duke, J. 2008. Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America. CRC Press. Florida. 832 p.
- Garduño-Pizaña C, Barrera-Necha LL and Rios Gomez MY. 2010. Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gadioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathology Journal 9: 103-111.
- Grainge M and Ahmed S. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley & Sons. New York, USA.
- Javaid A and Amin M. 2009. Antifungal activity of methanol and nhexane extracts of three *Chenopodium* species against *Macrophomina phaseolina*. Natural Products Research 23: 1120-1127.
- Kumar R, Kumar AM, Dubey NK and Tripathi YB. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic y antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology 115: 159-164.
- Marangon J, Newandram CG, Dev DJO and Moreira MF. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Chemical Ecology. 34: 1213-1218.
- Montes Belmont R, Cruz Cruz, V, Martinez Martinez G, Sandoval García G, Garcia Licon R, Zilch Domínguez Susano, Bravo Luna L, Bermudez Torres K, Dlores Moctezuma HE y Carvajal Moreno M. 2000. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología 18: 125-131.
- Montes-Belmont R y Flores-Moctezuma HE. 2001. Combate de *Fusarium thapsinum* y *Claviceps africana* mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales. Manejo Integrado de Plagas. 61: 23-30.
- Montes-Belmont R y Martínez GM. 1992. Control de la cenicilla *Erysiphe cichoracearum* y el mildiu de la calabacita *Pseudoperonospora cubensis* mediante extractos vegetales en Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca. Revista Mexicana de Fitopatología 10: 86-91.
- Palmero L., D., M. de Cara G., C. Iglesias G., G. Ruiz L and JC. Tello M. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 3 y 5: 1411-1418.
- Rafiq M, Nassir MA and Bhatti, MAR. 1984. Antifungal properties of certain common wild plants against different fungi. Pakistan Journal of Agricultural Research 5: 236-238.
- Ramachandran S., C. Larroche and A. Pandey. 2008. Production of spores. p: 231-246. In: Pandey, A., C. R. Soccol y C. Larroche (eds). Current Developments in Solid-State Fermentation. Springer Asiatech Publishers. New Delhi, India.
- Rauf S and Javaid A. 2013. Antifungal activity of different extracts of *Chenopodium album* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the cause of onion basal rot. International Journal of Agriculture and Biology 15: 367-371
- Rodríguez HC. 2005. Plantas contra plagas 2; epazote, hierba de la cucaracha, paraíso, higuera y sabadilla. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Latina, Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, Colegio de Posgraduados e Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Estado de México, México. 209 p.
- Saïdana D, Mahjoub S, Boussaada O, Chriaa J, Mahjoub M, Cheraïf I, Daami M, Mighri Z and Helal A. 2008. Antibacterial and antifungal activities of the essential oils of two saltcedar species from Tunisia. Journal of the American Oil Chemists' Society 85: 817-826.
- Tzakou O, Pizzimenti A, Pizzimenti FC, Sdrafkakis V and Galati EM. 2006. Composition and antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* L. Essential oil from Greece. Journal of Essential Oil Research 19: 292-294.
- Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM y Flores HE. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia 2: 68-75.
- Woldemichael GM and Wink M. 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. Journal of Agricultural Food Chemistry 49: 2327-2332.

Reducción en la Germinación *in vitro* de Conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con Jugo de Brócoli

Reduction in the *in vitro* Germination of Conidia of *Alternaria alternata* Isolated from *Eruca sativa* with Juice of Broccoli

Maria Antonia Flores Córdova, Posgrado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo. CP 56230, México; **María Teresa Martínez Damián**, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo. CP 56230, México; **Daniel Nieto Ángel**, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, Edo. de México. CP 56230, México; **Juan Enrique Rodríguez Pérez**, **María Teresa Colinas León**, **Juan Martínez Solís**, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México- Texcoco. Chapingo. CP 56230, México. Correspondencia: teremd13@gmail.com

(Recibido: Octubre 18, 2013 Aceptado: Abril 11, 2014)

Flores Córdova MA, Martínez Damián MT, Nieto Ángel D, Rodríguez Pérez JE, Colinas León MT y Martínez Solís J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 180-190.

Resumen. El hongo *Alternaria alternata*, es considerado uno de los principales patógenos de plantas, a nivel mundial ocasiona el síntoma de la mancha de la hoja en hortalizas. Aunque se han evaluado diferentes compuestos químicos para su control, el uso de productos biológicos representa una gran alternativa. Los glucosinolatos son productos naturales, derivados del brócoli, que contienen nitrógeno y azufre con actividad antifúngica. Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del jugo de brócoli *in vitro* sobre la germinación de conidios de *A. alternata*. Para la realización del experimento, se colectaron hojas de *Eruca sativa* (arúgula) con síntomas de la mancha de la hoja de las cuales se aisló e identificó al hongo *A. alternata*. Los conidios del hongo se colocaron en medio PDA, con diferentes concentraciones de glucosinolatos presentes en el jugo de brócoli 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01 y 0 µg/µL. Las concentraciones 0.07, 0.11, 0.15 µg/µL inhibieron en un 100 % la germinación de conidios de *A. alternata* a las 6 h de evaluación. La concentración letal media CL₅₀ fue de 0.028 µg/µL. Se concluye que los glucosinolatos presentes en el jugo de brócoli, poseen un potencial antifúngico y puede ser usado como tratamiento en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *A. alternata* en hortalizas.

Abstract. The fungus *Alternaria alternata*, is considered one of the major plant pathogens worldwide causing the symptom of leaf spot in vegetables. Glucosinolates are natural products derived from broccoli, containing nitrogen and sulfur, with antifungal activity. Based on the above, the present study aimed to evaluate the effectiveness of broccoli juice *in vitro* on germination of conidia of *A. alternata*. To carry out the experiment, leaves of *Eruca sativa* (arugula) with symptoms of leaf spot were collected, from which the fungus *A. alternata* was isolated and identified. Conidia of the fungus were placed on PDA medium with different concentrations of glucosinolates found in broccoli juice 0.15, 0.11, 0.07, 0.04, 0.01, and 0 ng/uL. It was observed that the concentrations 0.07, 0.1, 0.15 ug/uL inhibited 100 % spore germination of *A. alternata* at 6 h evaluation. The average lethal concentration LC₅₀ was 0.028 ug/uL. In conclusion, it can be mentioned that the glucosinolates present in broccoli juice, have an antifungal potential and can be used as post-harvest treatment, in order to reduce the damage caused by *A. alternata* in vegetables.

Additional keywords: Arugula, glucosinolates, antifungal, molecular identification, inhibition.

Economic losses, during postharvest handling of horticultural products, caused by various microorganisms are of considerable economic importance (Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Bautista-Baños *et al.*, 2000). One of the main causes of diseases in fruits and vegetables are produced by the action of fungal pathogens, most notably caused by *Alternaria alternata*.

Palabras clave adicionales: Arúgula, glucosinolatos, antifúngico, identificación molecular, inhibición.

Las pérdidas económicas durante el manejo postcosecha de productos hortícolas causadas por diversos microorganismos pueden ser de considerable importancia económica (Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Bautista-Baños *et al.*, 2000). Una de las causas principales de enfermedades en frutas y hortalizas son originadas por la acción de hongos fitopatógenos, entre las que destaca la causada por *Alternaria alternata*.

A. alternata es una especie cosmopolita que se encuentra como saprófito o fitopatógeno en un amplio rango de hospedantes y en subproductos (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). Este hongo presenta un micelio de color oscuro, conidios grandes, alargados y oscuros, o bien multicelulares en forma de pera con septos tanto transversales como longitudinales. Los conidios germinan y se introducen por los tejidos susceptibles a través de heridas y en poco tiempo producen nuevos conidios que pueden ser diseminados por el viento (Carrillo, 2003; Agrios, 2005). Esta especie infecta de manera foliar y causa manchas en la hoja de plantas de la familia de las *Brassicaceae* (Nidhi *et al.*, 2007), así como en frutos. En casi todos los casos, se comporta como un parásito de heridas. La penetración estomatal puede ocurrir cuando las plantas están fisiológicamente debilitadas, causando una destrucción relativamente lenta de los tejidos del hospedante. A medida que avanza la invasión de las hifas, destruyen las células de donde obtienen los nutrientes reduciendo el potencial fotosintético. La infección se caracteriza por la formación de lesiones necróticas de forma redonda sobre el haz de las hojas, su color se intensifica debido a la producción de estructuras propagativas del hongo (Thomma, 2003). La producción de conidios de *Alternaria* es óptima a 27 °C, pero es inhibida por debajo de 15 °C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35 °C (Rotem, 1994; Carrillo, 2003).

Este patógeno se ha observado en arúgula, planta perteneciente a la familia de las *Brassicaceae* que tiene su origen en la región Mediterránea y es conocida por su agradable sabor amargo y alto contenido de fitonutrientes como los carotenoides, vitamina C, fibra dietética polifenoles y flavonoides que promueven la salud (Barillari *et al.*, 2005). Así mismo, tiene una larga historia de uso medicinal para diversos fines: astringente, depurativa, diurética, digestiva, emoliente, tónico, estimulante y laxante (Durazzo *et al.*, 2003). Esta planta se encuentra disponible todo el año en el mercado; ya que tienen la capacidad de rebrotar, lo que permite más de una cosecha al año (Koukounaras *et al.*, 2010). Por lo que el consumo de hortalizas recién cortadas es cada vez más importante en la dieta de los consumidores debido a los hábitos de alimentación saludable que está adquiriendo la población (Oms-Oliu *et al.*, 2006), teniendo como resultado que los consumidores demanden alimentos naturales, de apariencia y valor nutricional y microbiológicamente seguros (García *et al.*, 2006). En relación a la carga microbiológica, arúgula

A. alternata is a broad-based species found as a saprophyte or plant pathogen in a wide range of hosts and subproducts (Andersen *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). This fungus has a dark color mycelium, large, elongated and dark conidia or multicellular pear-shaped, with both transverse and longitudinal septa. Conidia germinate and get introduced through susceptible tissues (wounds) and very soon they produce new conidia that can be dispersed by the wind (Carrillo, 2003; Agrios, 2005). This species infects in foliar way and causes leaf spots on plants of the *Brassicaceae* family (Nidhi *et al.*, 2007), as well as in fruits. In most cases, it behaves as a wound parasite. Stomatal penetration can occur when plants are physiologically weakened, causing a relatively slow destruction of host tissues. As the hyphae invasion progresses, they destroy the cells that provide them nutrients by reducing the photosynthetic potential. A characteristic of the infection is the formation of necrotic lesions of round shape on the upper side of the leaf, the color is intensified due to the production of fungal propagative structures (Thomma, 2003). *Alternaria* conidia production is optimum at 27 °C, but is inhibited below 15 °C, although growth range is between 0 and 35 °C (Rotem, 1994, Carrillo, 2003).

This pathogen has been observed in arugula, plant belonging to the *Brassicaceae* family, which originated in the Mediterranean region and it is known for its pleasant bitter taste and high in phytonutrients such as carotenoids, vitamin C, dietary fiber, polyphenols and flavonoids which are all health-promoting (Barillari *et al.*, 2005). It has also a long history of medicinal use for various purposes: astringent, depurative, diuretic, digestive, emollient, tonic, stimulant and laxative (Durazzo *et al.*, 2003.). This plant is available throughout the year on the market; as they have the ability to resprout, allowing more than one crop per year (Koukounaras *et al.*, 2010). The freshly cut vegetable consumption is becoming increasingly important in the diet of consumers, because of the healthy eating habits that the population is adopting (Oms-Oliu *et al.*, 2006) resulting in higher demand of natural foods of nice appearance, high nutritional value and microbiologically safe (García *et al.*, 2006). Regarding the microbiological load, arugula is susceptible to *Alternaria*, which is a postharvest fungal pathogen that causes product quality loss because of major tissue damage, which occurs during the marketing process from harvest to the end consumer, reducing its life span (Kader, 2007; Ferrato *et al.*, 2012).

It is noteworthy that fungal diseases management is currently based on the use of synthetic chemicals. In the last decades, efforts have been directed to obtain a better understanding of the biological effects of compounds isolated from plants that have potential effect in disease control, because of the recent trend to use less harmful alternatives to the environment to control fungi and rely less on synthetic products. It is expected that the use of natural compounds have a minor impact on the ecosystem, because unlike chemicals, they are biodegradable and do not accumulate in the environment (Báez-Flores *et al.*, 2008).

Among the most common strategies is the use of natural compounds derived from plants such as essential

es susceptible a *Alternaria* un hongo patógeno de postcosecha causante de la pérdida de calidad del producto por los importantes daños en el tejido, los cuales se presentan durante los procesos de comercialización desde la cosecha hasta el consumidor final, reduciendo su vida útil (Kader, 2007; Ferrato *et al.*, 2012).

Es importante destacar que el manejo de las enfermedades fúngicas se basa, en la utilización de productos químicos sintéticos. En las últimas décadas, los esfuerzos se han dirigido a obtener una mejor comprensión de los efectos biológicos de compuestos aislados de plantas que tienen un efecto potencial en el control de enfermedades, debido a la reciente tendencia a utilizar alternativas menos perjudiciales al ambiente para el control de hongos y a reducir la dependencia de productos sintéticos. Se espera que el uso de compuestos naturales tenga un menor impacto sobre los ecosistemas, ya que a diferencia de los productos químicos, éstos son biodegradables y no se acumulan en el medio ambiente (Báez-Flores *et al.*, 2008).

Entre las estrategias más comunes está el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas como los aceites esenciales, compuestos aromáticos (Tripathi y Dubey, 2004) y las moléculas producidas por varios sistemas de defensa de las plantas, éste último grupo de componentes, incluye algunas moléculas como los glucosinolatos (GLs), que en pruebas biológicas específicas han mostrado una fuerte actividad contra un amplio intervalo de patógenos (Mari *et al.*, 2008). Los glucosinolatos pertenecen al grupo de los tioglucósidos, formados por una β -tioglucosa, una oxima sulfonada, y una cadena lateral variable derivada de un aminoácido, se encuentran almacenados en vacuolas y son liberados al sufrir daño celular, luego de que entran en contacto con la enzima mirosinasa y son hidrolizados en diferentes productos (Molina-Vargas y Bentura-Castellanos, 2009). Con frecuencia son tres grupos de acuerdo a la naturaleza de su cadena lateral: alifáticos, aromáticos e indólicos. Se han aislado y caracterizado aproximadamente 120 GLs de especies de plantas de la familia *Brassicaceae* y familias relacionadas, como son: el brócoli, la col y coliflor entre otras, quienes contienen altos niveles de GLs. Estos vegetales y algunas plantas comestibles del orden *Caparrales* son la fuente de todos los GLs de la dieta humana (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

El amplio intervalo de perfiles de GLs restringidos a las familias *Brassicaceae*, *Capparidaceae* y *Resedaceae*; almacenados en diferentes tejidos de la planta e involucrados contra las diferentes enfermedades vegetales, ofrece la posibilidad de seleccionar especies de plantas *Brassicaceae* como el brócoli, con mayor potencial fúngico. Autores como Brandi *et al.* (2006) y Sisti *et al.* (2006) probaron el jugo de *Brassica oleracea*, comprobaron la actividad antimicrobial y antifúngica del extracto, además se encontró ser efectivo en la inhibición y crecimiento de *Blastoconidia* y *Candida albicans*.

Por lo anteriormente expuesto el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia del extracto de jugo de brócoli *in vitro* sobre *A. alternata* y proponer el uso posterior del mismo por su actividad antifúngica durante

oils, aromatic compounds (Tripathi and Dubey, 2004) and molecules produced by various plants defense systems, the latter group of components, includes some molecules such as glucosinolates (GLs), which in specific biological tests have shown a strong activity against a broad range of pathogens (Mari *et al.*, 2008). Glucosinolates belong to the thioglucosides group, which are formed by a β -thioglucose, a sulphonated oxime and a variable side chain derived from an amino acid, which are stored in vacuoles and released after cell damage, after contact with the myrosinase enzyme and they are hydrolyzed in different products (Molina-Vargas and Bentura-Castellanos, 2009). Often there are three groups according to the nature of their side chain: aliphatic, aromatic and indole. About 120 GLs have been isolated and characterized from plants of the *Brassicaceae* family and related families, such as: broccoli, cabbage and cauliflower among others, which have high levels of GLs. These vegetables and some edible plants of the *Caparrales* order are the source of all GLs of the human diet (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

The wide range of restricted GLs profiles to the *Brassicaceae*, *Capparidaceae* and *Resedaceae* families, stored in different plant tissues and involved against various plant diseases, offers the possibility of selecting plants of the *Brassicaceae* species such as broccoli, with more fungal potential. Authors like Brandi *et al.* (2006) and Sisti *et al.* (2006) tested the *Brassica oleracea* juice, and they demonstrated the antimicrobial and antifungal activity of the extract, also it was found to be effective in *Blastoconidia* and *Candida albicans* inhibition and growth.

Based on the above, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the efficacy of broccoli juice extract on *A. alternata* and propose its further use because of its antifungal activity during postharvest in arugula.

MATERIALS AND METHODS

Isolation. Isolates of the fungus were obtained from arugula leaves with leaf spot symptoms from Morelos state, Mexico. From the symptoms, sections of tissue of the terminal part of the lesion were cut and disinfected by immersion in a 2 % sodium hypochlorite solution for 2 min. Then, the tissues were rinsed twice with distilled water and placed on absorbent paper towels to remove excess moisture. Each piece of tissue was seeded in Petri dishes with potato dextrose agar medium (PDA).

Once the mycelium development was observed, some monoconidial cultures were done by placing 1000 μ L of distilled water with a micropipette on each isolate. Water was mixed with the mycelium and the conidia were detached by using a sterile glass rod, then 100 μ L of the conidial suspension were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and filling it with distilled water to the mark. The tube content was poured to a petri dish with agar water (AW), it was distributed throughout the bed and allowed to stand for 5 s, and then any water excess contained in the box was discarded on sterile paper towel. Each isolate was incubated at 27°C for 24 h.

By using an American Optical Microscope Model 1130 (Microstar, USA), a single germinated conidium was

postcosecha en arúgula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. Los aislados de hongos se obtuvieron a partir de hojas de arúgula con síntomas de la mancha de la hoja procedentes del estado de Morelos, México. De los síntomas se realizaron cortes de tejido de la parte terminal de la lesión y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min. Posteriormente los tejidos se enjuagaron dos veces con agua destilada y se colocaron sobre toallas de papel absorbente para retirar el exceso de humedad. Cada porción de tejido se sembró en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA).

Una vez que se observó el desarrollo de micelio se realizaron cultivos monoconidiales colocando 1000 µL de agua destilada con una micropipeta sobre cada uno de los aislamientos. El agua se mezcló con el micelio y los conidios se desprendieron con la ayuda de una varilla de vidrio estéril, posteriormente se recuperaron 100 µL de la suspensión de conidios, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se aforó con agua destilada. El contenido del tubo se vació a una caja de Petri con agua-agar (AA) se distribuyó en toda la caja y se dejó reposar por 5 s, posteriormente se desechó todo el exceso de agua contenido en la caja sobre sanitas estériles. Cada aislamiento se incubó a 27 °C durante 24 h.

Con la ayuda de un microscopio American Optical Microscope model 1130 (Microstar, USA), de cada aislamiento se seleccionó un conidio individual germinado y se transfirió para su incremento a medio PDA para mantenerse en incubación a 27 °C durante 6 d. La especie se identificó por medio de las claves morfológicas de Ellis (1971), Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994).

Identificación de *Alternaria*. Para identificar el hongo aislado, se sembraron cultivos monoconidiales en medio papa-zanahoria-agar (PZA), los cuales se mantuvieron por 8 d a temperatura de 27±2 °C con luz blanca fluorescente. La identificación se hizo con base a las características del micelio, color de colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios. Para observar estas estructuras se hicieron preparaciones permanentes de los hongos en glicerol al 50 % acidificado con 0.5 mL de HCL al 12N y se observaron en el microscopio de luz Jenaval (Carl Zeiss, Germany). Para la identificación de los aislamientos a nivel de especie, se tomaron fotografías con una cámara digital instalada en el objetivo 40 X del microscopio compuesto y con el programa Motic M.C. Cámara (Motic, China); se midió el ancho y la longitud de 100 conidios y conidióforos, considerados al azar.

El color de la colonia se determinó examinando la masa conidial y micelial, las observaciones de los cultivos monoconidiales se realizaron a partir de aislamientos mantenidos a 27 °C durante 8 d.

Pruebas de patogenicidad. Para comprobar la patogenicidad del hongo, se inocularon hojas de arúgula, las mismas que se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min y se enjuagaron con agua destilada dos veces. Del hongo aislado en PDA,

selected from each isolate and transferred to PDA medium in order to keep incubated at 27 °C for 6 d. The species were identified by using morphological keys of Ellis (1971), Barnett and Hunter (1998) and Rotem (1994).

***Alternaria* identification.** In order to identify the isolated fungus, monoconidial cultures were seeded in potato-carrot-agar (PCA) medium, which were maintained for 8 d at 27 ± 2 °C under fluorescent white light. Identification was made based on the mycelium characteristics, colony color, conidiophores shape; and size, shape and color of the conidia. In order to be able to observe these structures, permanent preparations of the fungus were done in 50 % glycerol, acidified with 0.5 mL of 12N HCL and observed under the light microscope Jenaval (Carl Zeiss, Germany). For identification of isolates to the species level, photographs were taken with a digital camera installed on the 40 X compound microscope with Motic MC program Camera (Motic, China); the width and length of 100 conidia and conidiophores randomly chosen, were measured.

The color of the colony was determined by examining the conidial and mycelial mass, the observations of monoconidial cultures were done from isolates maintained at 27 °C for 8 d.

Pathogenicity tests. In order to test the pathogenicity of the fungus, arugula leaves were inoculated, disinfested by immersion in a 2 % sodium hypochlorite solution for 3 minutes and rinsed twice with distilled water. From the isolated fungus in PDA, a 1X10⁶ conidia/mL suspension was prepared using a hemacytometer.

Inoculation was performed on the upper side of the leaf, 20 µL of the conidia solution with a micropipette were placed on the wounds made with a sterilized toothpick, and in the control only distilled water was added to the wounds. The inoculated leaves were kept in a moist chamber at room temperature (24 ± 2 °C) for 10 d. Ten replications were performed, and one plant was considered the experimental unit.

According to Koch's postulates, when this period concluded, the presence of symptoms was observed (Agrios, 2005) and they were compared with the initial symptoms, from which isolation was done; also, the re-isolation of the fungus was performed and it was confirmed that it corresponded to the isolate used for inoculation. Preservation of monoconidial cultures was done in test tubes with PDA medium and covered with sterile mineral oil.

Molecular identification. In order to confirm the morphological identification, DNA (deoxyribonucleic acid) extraction was done. DNA extraction was performed from a monoconidial culture by using a DNeasy Mini kit (Qiagen, USA) according to manufacturer's instructions. The DNA from each of the isolates was refrigerated at -20 °C until further use.

An amplification of internal regions ITS1 and ITS2, located in the internal transcribed spaces of ribosomal genes (rDNA) located between the small subunits 18S, 5.8S and 28S was done by using a combination of primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). The PCR conditions used for amplification were as follows: sterile ionized water

se preparó con ayuda de un hematocitómetro una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios/mL.

La inoculación se realizó sobre el haz de la hoja, se colocaron 20 μ L de la solución de conidios con una micropipeta, sobre heridas realizadas con un palillo de madera esterilizado, al testigo, solo se le adicionó agua destilada sobre las heridas. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 10 d. Se realizaron 10 repeticiones, se consideró una planta como unidad experimental.

De acuerdo a los postulados de Koch, al concluir este periodo, se observó la presencia de síntomas (Agrios, 2005) y se compararon con los síntomas iniciales de donde se realizó el aislamiento; así mismo, se realizó el reaislamiento del hongo y se corroboró que correspondiera al aislamiento inoculado. La preservación de los cultivos monoconidiales se hizo en tubos de ensaye con medio PDA y cubiertos con aceite mineral estéril.

Identificación molecular. Para confirmar la identificación morfológica se llevó a cabo la extracción de DNA (ácido desoxirribonucleico). La extracción de DNA se realizó a partir de un cultivo monoconidial con el uso del DNeasy Mini kit (Qiagen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA de cada uno de los aislamientos se conservó en refrigeración a -20 °C hasta su uso posterior.

Se realizó una amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los espacios transcritos internos de los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S, 5.8S y la subunidad larga 28S, se utilizó una combinación de iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Las condiciones de la PCR usadas para la amplificación fue la siguiente: agua estéril ionizada (12.145 μ L), Buffer PCR 5x, $MgCl_2$ a 1.5 mM (2.75 μ L), dNTP's a 0.2 mM (1.375 μ L), *Taq* DNA-polimerasa 1.5 unidades (0.33 μ L) (Promega, USA) iniciadores ITS5 e ITS4 a 10 pM (2 μ L) de cada uno y muestra de DNA a una concentración de 20 ng (1 μ L). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador TC-512 (Techne, USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 s, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min (White *et al.*, 1990). El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purificación Kit (Qiagen, USA) y se ajustó a una concentración de 50 ng/ μ L con un volumen de 15 μ L. La amplificación del producto se separó en un gel de agarosa al 1.5 % por electroforesis en 1x TAE buffer, las bandas se visualizaron en un transiluminador Dial Intensity UVP de luz UV modelo KD1208PTS (Scorpion Scientific, Taiwan). Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones en un 3730XL de Applied Biosystems.

Las secuencias obtenidas se ensamblaron y se compararon con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Preparación del extracto de jugo crudo de brócoli. Material vegetal. El material vegetal se obtuvo del

(12.145 μ L), PCR Buffer 5x, 1.5 mM (2.75 μ L) $MgCl_2$, 0.2 mM (1.375 μ L) dNTP's, *Taq* DNA-polymerase 1.5 units (0.33 μ L) (Promega, USA) and 10 pM (2 μ L) of each ITS4 and ITS5 primers, and DNA sample at a concentration of 20 ng (1 μ L). The amplification reaction was performed in a TC-512 (Techne, USA) thermocycler with the following program: initial denaturation at 95 °C for 2 min, 30 cycles of denaturation, alignment and extension at 95 °C for 1 min, 50 °C for 30 s, 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min (White *et al.*, 1990). The PCR product was purified according to the protocol of the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) and adjusted to a concentration of 50 ng/ L with a 15 L volume. Amplification of the product was separated on a 1.5 % agarose gel by electrophoresis in 1x TAE buffer, the bands were visualized with a transiluminador Dial Intensity UVP of UV light model KD1208PTS (Scorpion Scientific, Taiwan). The PCR products were sequenced in both directions with a 3730XL Applied Biosystems.

The obtained sequences were assembled and compared with those deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Preparation of broccoli crude extract juice. Plant material. The plant material was obtained from the food market of the city of Texcoco, Mexico, which was then analyzed at the Laboratory of Fruit Postharvested of the Universidad Autónoma de Chapingo. For the extraction, broccoli florets and stems were used, they were disinfested with 100 mg/L sodium hypochlorite and grounded with a juice extractor model 140-1-03 (Moulinex, Mexico); then, they were allowed to stand for 1 h. After this time, sample were transferred to a centrifuge at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was stored at -20 °C until use.

Method to determine glucosinolates in broccoli, by spectrophotometry. For the lyophilization process, broccoli juice was placed in vials that were frozen at -20 °C for 24 h, then placed in the lyophilizer for 5d until dehydration. For GLs determination, Jezek *et al.* (1999) methodology was used: approximately 0.5 mg of lyophilized extract were mixed with 7.5 mL of 0.2 M acetate buffer, pH 4.2 and 1.5 mL of lead acetate and barium 0.5 M. The mixture was vigorously vortexed and 0.4 g of polyvinylpyrrolidone (PVPP) were added and incubated at room temperature with stirring for 15 min. Then 1.5 mL of 2 M sodium sulfate were added and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature, after this time, 0.9 mL of PVPP-treated extract was mixed with 0.9 mL of 2 M sodium hydroxide and it was incubated at room temperature for 30 min; 0.138 mL of concentrated hydrochloric acid were added to the mixture and centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. For the spectrophotometric determination, 0.5 mL supernatant were mixed with 0.5 L of 2 mM ferricyanide solution in 0.2 M phosphate buffer pH 7.0. Lastly, the absorbance of the solution was measured at 420 nm within 15 s using 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 as a blank. Additionally, the blank analysis was done by mixing 0.5 mL of hydrolyzed extract with 0.5 mL 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0. In order to build the calibration curve, sinigrina 5.60×10^{-3} M was used as well as dilutions from 0 -

mercado de abastos de la ciudad de Texcoco, México, el cual se trasladó al laboratorio de Postcosecha de frutales de la Universidad Autónoma de Chapingo. Para la extracción se utilizaron floretes y tallos de brócoli, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 100mg/L y se molieron en un extractor de jugo modelo 140-1-03 (Moulinex, México); posteriormente se dejaron reposar por espacio de 1 h. Después de este periodo la muestra se pasó a una centrifuga a 10,000 rpm por 10 min, obteniéndose un sobrenadante el cual se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Método para determinar glucosinolatos en brócoli, mediante espectrofotometría. Para el proceso de liofilizado, el jugo de brócoli se colocó en viales los cuales se congelaron a -20 °C, durante 24 h, posteriormente se colocaron en el liofilizador durante 5 d hasta su deshidratación. Para la determinación de los GLs se utilizó la metodología establecida por Jezek *et al.* (1999), se tomaron aproximadamente 0.5 mg de extracto liofilizado, se adicionaron 7.5 mL de buffer acetato 0.2 M, pH 4.2 y 1.5 mL de acetato de plomo y bario 0.5 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex. Se adicionaron 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se incubó a temperatura ambiente, con agitación, por 15 min. Después se agregó 1.5 mL de sulfato de sodio 2 M y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, después de este tiempo se agregó 0.9 mL de extracto tratado con PVPP se mezcló con 0.9 mL de hidróxido de sodio 2M y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. A la mezcla se adicionó 0.138 mL de ácido clorhídrico concentrado y se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min. Para la determinación espectrofotométrica se tomaron 0.5 mL de sobrenadante y se mezcló con 0.5 µL de solución de ferricianuro 2mM en buffer fosfato 0.2 M pH 7.0. Finalmente se midió la absorbancia de la solución a 420 nm antes de 15 s usando buffer fosfato 0.2 M pH 7.0 como blanco. Adicionalmente, se realizó la medida del blanco de muestra para lo cual se tomaron 0.5 mL de extracto hidrolizado y 0.5 mL de buffer fosfato 0.2 M, pH 7.0. Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el patrón sinigrina 5.60×10^{-3} M y se hicieron diluciones de 0, a 90 µL de solución. Las medidas se hicieron sobre cada dilución. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los GLs obtenidos del jugo de brócoli. El modelo utilizado fue: $Y = -0.0041x + 0.9313$ (R^2 de 0.97, $P = 0.002$) y la concentración de Glucosinolatos obtenida fue de 0.0029 µg/mL.

Evaluación del efecto del jugo de brócoli sobre la germinación de conidios. Bioensayo. Se colocaron 150 µL de medio de cultivo PDA en recipientes translúcidos con una capacidad de 300 µL. Antes de que el medio de cultivo solidificara, se mezcló con 50 µL del extracto puro de brócoli diluido en agua con la finalidad de que se obtuvieran las concentraciones utilizadas en los bioensayos (Cuadro 1).

Después se añadió 20 µL de la suspensión de conidios, sobre cada uno de los recipientes, los que se colocaron en cámara húmeda y se incubaron por 2, 4 y 6 h a $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Posteriormente con la ayuda de un microscopio se cuantificó los conidios germinados, se consideraron 100 conidios al azar, de cada concentración se hicieron tres

90 µL of solution. Measurements were made on each dilution. From spectrophotometry data a regression model was adjusted, in order to determine the concentration of the GLs obtained from broccoli juice. The model used was: $Y = -0.0041x + 0.9313$ ($R^2 = 0.97$, $P = 0.002$) and the concentration of glucosinolates obtained was 0.0029 g/mL.

Evaluation of the effect of broccoli juice on the conidia germination. Bioassay. 150 µL of PDA culture medium were placed in translucent containers with a capacity of 300 µL. Before the culture medium was solidified, it was mixed with 50 µL of pure broccoli extract diluted in water, in order to obtain the concentrations used in the bioassays (Table 1).

Then 20 µL of the conidial suspension were added to each of the containers which were placed in a humidity chamber and incubated for 2, 4 and 6 h at $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Subsequently, germinated conidia were quantified with a microscope, considering 100 random conidia, three replicates of each concentration were made.

Statistical Analysis. The data obtained were analyzed by variance analysis and (Tukey, $p = 0.05$) mean comparison tests ($p = 0.05$). In order to calculate the average effectiveness, the effective concentration 50 % (LC_{50}) was calculated using the Probit procedure (SAS Institute, USA). Additionally, the inhibition % was estimated with the following formula:

$$IN (\%) = \frac{a - b}{a} 100$$

Where: a = Total germinated conidia of the blank
b = Total germinated conidia of the treatment

RESULTS AND DISCUSSION

Pathogenicity tests. Two days after inoculation, small spots on the surface of the leaves (Figure 1) were observed, the initial lesions were smaller than 1 mm in diameter, circular and scattered on the leaves, which were manifested by the presence of circular dark brown spots and

Cuadro 1. Concentración del extracto de jugo de brócoli, para determinar el efecto de inhibición sobre la germinación de conidios de *Alternaria alternata*.

Table 1. Concentration of broccoli juice extract to determine the inhibitory effect on the germination of *Alternaria alternata* conidia.

Tratamiento	Cantidad de agua mL	Extracto de Jugo de brócoli mL (Glucosinolatos)	Concentración final del extracto de brócoli en un volumen de 50 mg/mL
1	0	50	0.15
2	12.5	37.5	0.11
3	25	25	0.07
4	37.5	12.5	0.04
5	45	5	0.01
6	50	0	0

repeticiones.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey, $p=0.05$). Para el cálculo de la efectividad media se determinó la concentración efectiva 50 % (CL_{50}) la cual se calculó mediante el procedimiento Probit (SAS Institute, USA). Así mismo se determinó el % de inhibición mediante la fórmula:

$$IN (\%) = \frac{a - b}{a} 100$$

Donde: a= El total de conidios germinados del testigo

b= al total de conidios germinados del tratamiento

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad. A los dos días después de la inoculación se observaron pequeñas manchas sobre la superficie de las hojas (Figura 1), las lesiones iniciales fueron pequeñas < 1 mm de diámetro, circulares y dispersas en las hojas, las cuales se manifestaron con la presencia de manchas circulares de color café oscuro, a medida que las lesiones se ampliaron se convirtieron en irregulares. Luego al unirse las manchas se observaron áreas necrosadas grandes que llegaron a cubrir la hoja entera. Estos síntomas coinciden con los reportados por Mercado Vergnes *et al.* (2006).

Then, after the large necrotic spots joined together, they covered the whole leaf. These symptoms are consistent with those reported by Mercado Vergnes *et al.* (2006).

***Alternaria* morphological characterization.** The fungus causing leaf spot was identified as *A. alternata* and it was characterized by showing dark green colonies in PCA culture medium. Under the microscope, simple septate conidiophores of light brown color, lineal or sometimes geniculate were observed, with 16.1- 57.9 x 1-2.4 μm length, obclavate muriform conidia with variable transversal and longitudinal septa of 1-7 and 0-3, respectively; conidia have a range of 19.2-55.9 μm long, and 6.1- 11.8 μm wide, short, cylindrical, and pale peak; septa are muriform and according to Saccardo's classification (1877), conidia are dictyosporous. The catenulate showed 5-10 conidia, with secondary and even tertiary branching, and such characteristics correspond to the *A. alternata* species according to Ellis keys and descriptions (1971), Barnett and Hunter (1998), and Rotem (1994). This also corresponds with López and Cabral (1999), Andersen *et al.* (2001), and Fraire-Cordero *et al.* (2010) reports (Figure 1).

Molecular identification. In order to determine the species, the sequence was compared with BLAST option of NCBI, and the percentage of similarity was of 99 % with *A. alternata* (Fries) species; this result coincides with

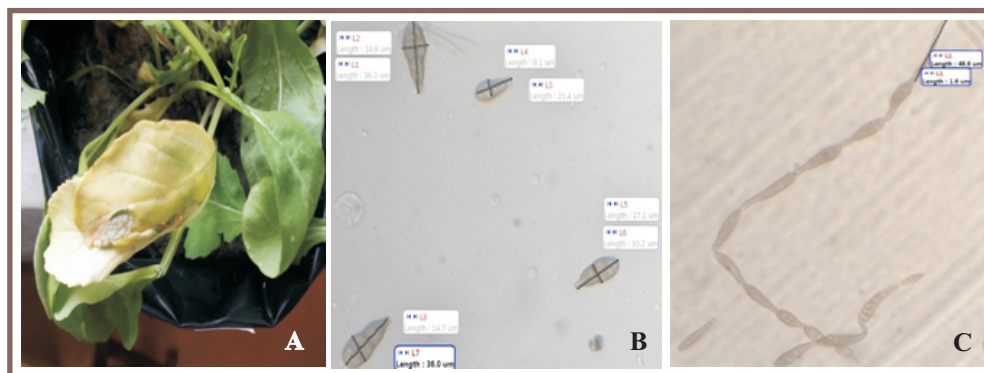


Figura 1. A) hojas de arúgula inoculadas con *Alternaria*. B) fotomicrografía de conidios, C) cadenas de conidios y conidióforo. Figure 1. A) Arugula leaves inoculated with *Alternaria alternata* B) Photomicrograph of conidia, C) chains of conidia and conidiophore.

Caracterización morfológica de *Alternaria*. Se identificó al hongo causante de las manchas foliares como *A. alternata*, se caracterizó por presentar colonias de color verde oscuro, en medio de cultivo PZA. Al microscopio se observaron conidióforos simples de color café claro tabicados, lineal o a veces geniculado, con una longitud de 16.1-57.9 x 1-2.4 μm , conidios obclavados muriformes, con septa transversal, longitudinal variable de 1-7 y 0-3 respectivamente y conidios que van de 19.2- 55.9 μm de largo, y de 6.1 a 11.8 μm de ancho y con pico corto cilíndrico pálido, los septos son muriformes y de acuerdo a la clasificación de Saccardo (1877) los conidios son dictyoesporas. La catenulación presentó de 5 a 10 conidios, se presentó ramificación secundaria e incluso ramificación terciaria, características que corresponden a la especie de *A. alternata* de acuerdo a las claves y descripciones de Ellis

Serdani *et al.* (2002) and Mercado Vergnes *et al.* (2006) reports.

Effect of broccoli juice on *Alternaria*. The analysis of variance showed statistically significant differences in the germination percentage of conidia, based in the GLs concentrations present in broccoli juice, as shown in Table 2.

The control showed the highest percentage of germination 6 h after the conidia were placed on PDA.

Rotem (1994) mentioned that under favorable conditions, most *Alternaria* species germinate in about 1-3 hours. At concentrations of 0.15, 0.11 and 0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a no germination rate was observed, while at concentrations of 0.04, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ had little effect, indicating that at higher concentration, lower growth. Compared to the control, all treatments with GLs present in broccoli juice influenced the fungus growth. It has also been shown that when the

(1971), Barnett y Hunter (1998) y Rotem (1994). Lo que corresponde con lo reportado por López y Cabral (1999), Andersen *et al.* (2001) y Fraire-Cordero *et al.* (2010) (Figura 1).

Identificación Molecular. Para determinar la especie, la secuencia se comparó con la opción BLAST del NCBI, obteniéndose un porcentaje de similitud de 99 % con la especie *A. alternata* (Fries), resultado que coincide con el trabajo realizado por Serdani *et al.* (2002) y Mercado Vergnes *et al.* (2006).

Efecto del jugo de brócoli sobre *Alternaria*. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación de los conidios, en función de las concentraciones de GLs presentes en el jugo de brócoli, como se puede observar en el

Brassica GLs are applied at 0.054 µg/mL concentration in the form of crude aqueous juice, the *Candida albicans* growth is inhibited up to 95 % after 4 h incubation (Sisti *et al.* 2006), similar results have been found in the present study.

In terms of conidia inhibition percentage of *A. alternata*, Troncoso-Rojas *et al.* (2005) reported concentrations of isothiocyanates derived from GLs of 0.025, 0.5, 0.1, 0.2 and 0.4 mg mL⁻¹ with 75, 87 and 100 % similarity to those found in this work; however, it is important to mention that the other authors worked with commercial compounds and in this study the broccoli juice was freshly collected, prepared and used. Also Hafidh *et al.* (2011) tested (in 11 bacteria and 11 fungi) the antimicrobial effect of red cabbage and they used concentrations from 0 to

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición y germinación de conidios de *Alternaria alternata* en diferentes concentraciones de glucosinolatos presentes en jugo de brócoli.

Table 2. Percentage of inhibition and conidia germination of *Alternaria alternata* in different glucosinolates concentrations found in broccoli juice.

Concentración (Glucosinolatos) mg/mL	Germinación % 2 h	Germinación % 4 h	Germinación % 6 h	Inhibición %
0	26 a	55 a	96 a	4 d
0.01	22 b	45 b	91 b	9 c
0.04	13 c	31 c	44 c	54 b
0.07	0 d	0 d	0 d	100 a
0.11	0 d	0 d	0 d	100 a
0.15	0 d	0 d	0 d	100 a
DMSH	3.4	3.9	3.2	2.4
Pr < F	0.001**	0.001**	0.001**	0.001**

Medias con la misma letra dentro de las columnas, no son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey con $p < 0.05$

DMSH: Diferencias mínimas significativa honesta.

**Significativo al 1 %.

Cuadro 2.

El control presentó el porcentaje de germinación más alto a las 6 h, después de que los conidios se colocaron en el PDA.

Rotem (1994), menciona que en condiciones favorables, la mayoría de especies de *Alternaria* germinan en aproximadamente 1-3 horas. En las concentraciones de 0.15, 0.11 y 0.07 µg/µL, no se observó germinación, mientras que la concentración a 0.04, 0.01 µg/µL tuvieron un menor efecto, lo que indica que a mayor concentración menor crecimiento. En comparación con el testigo, todos los tratamientos con GLs presentes en el jugo de brócoli influyeron en el crecimiento del hongo. Se ha demostrado también que cuando se aplican los GLs de *Brassica* a una concentración de 0.054 µg/mL en forma de jugo acuoso crudo, el crecimiento de *Candidas albicans* se inhibe hasta un 95 % después de 4 h de incubación (Sisti *et al.*, 2006), resultados similares se han encontrados en el presente estudio.

En cuanto al porcentaje de inhibición de conidios de *A. alternata*, Troncoso-Rojas *et al.* (2005) reportan concentraciones de isotiosianatos derivados de los GLs de

600 mg/ml for bacteria and 0 to 350 mg/mL for fungi, obtaining the minimum concentration for each organism.

Moreover, Hang and Flieming (1994) and Mucete *et al.* (2006) showed that isothiocyanates derived from GLs have an effective antibacterial activity in *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizopus nigricans* and lactic acid bacteria, with concentrations of 142 mg/100 g⁻¹ with positive effects at 24 and 48 h. Similar behavior was observed by Mari *et al.* (2008) with 85 % in the inhibition of *Monilia* spp. spore at a concentration of 0.04 to 0.27 mg L⁻¹ when using different isothiocyanates.

Figure 2 shows the behavior of the different broccoli juice concentrations containing GLs on *A. alternata* conidia germination observed in the microscope.

The GLs present in broccoli juice influenced *A. alternata* inhibition and they did not exhibit any conidia germination (Figure 2). Likewise, the effective concentration 50 % (LC₅₀) that allowed the *A. alternata* conidia germination of broccoli extract was 0.028 µg/µL and the concentration that completely inhibited the conidia germination was 0.07 µg/µL. The GLs inhibitory effect on

0.025, 0.5, 0.1, 0.2 y 0.4 mg mL⁻¹ con 75, 87 y 100 %, igual al encontrado en este trabajo, sin embargo cabe mencionar que ellos trabajaron con compuestos comerciales y en este estudio se utilizó el jugo de brócoli recién extraído. Igualmente Hafidh *et al.* (2011) probaron en (11 bacterias y 11 hongos) el efecto antimicrobiano del extracto de col roja y utilizaron concentraciones de 0 a 600 mg/mL para bacterias y de 0 a 350 mg/mL para los hongos, logrando obtener la concentración mínima para cada organismo.

Por otra parte, Hang y Flieming (1994) y Mucete *et al.* (2006) demostraron que los isotiocianatos derivados de los GLs tienen una eficaz actividad antibacteriana en *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizopus nigricans* y bacterias de ácido láctico, con concentraciones de 142 mg/100 g⁻¹, con efectos positivos a las 24 y 48 h. Comportamiento similar fue el que observó Mari *et al.* (2008) con un 85 % en la inhibición de esporas de *Monilia* spp. a una concentración de 0.04 hasta 0.27 mg L⁻¹ al utilizar diferentes isotiocianatos.

En la Figura 2 se puede apreciar el comportamiento de las concentraciones de jugo de brócoli con contenido de GLs sobre la germinación de conidios de *A. alternata* observadas en el microscopio.

Los GLs presentes en el jugo de brócoli influyeron en la inhibición de *A. alternata*, no presentaron germinación alguna de los conidios (Figura 2). Así mismo la concentración efectiva 50 % (CL₅₀) que presentó la germinación de conidios de *A. alternata* al extracto de brócoli fue de 0.028 µg/µL y la concentración que inhibió por completo la germinación de conidios fue de 0.07 µg/µL.

conidia germination of phytopathogenic fungi has also been observed by Vargas-Arispuro *et al.* (2005) who tested *Brassica oleracea* crude extracts and reported 100 % growth inhibition of *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert at 10 mg mL⁻¹ concentration.

Another example of the fungicidal potential of the *Brassica* spp. genus, has been shown *in vitro* with aqueous extracts of rape or turnip, which completely inhibited the growth of *Aphanomyces euteiches* oospores, also some volatile substances from *Brassica rapa* plants that inhibited mycelial growth of *Rhizoctonia solani* at a concentration of 20 mg g⁻¹ (Masahiro *et al.*, 2006).

Brandi *et al.* (2006) by using *Brassica oleracea* juice reported that antimicrobial effectiveness is due to a mechanism of action by blocking the sulfhydryl groups of bacteria. Furthermore, Delaquis and Mazza (1995), affirm that the effect is due to inactivation of intracellular enzymes, via oxidative cleavage of disulfide bonds. Also, Kojima *et al.* (1971) Banks *et al.* (1986), and Troncoso-rojas *et al.* (2005), reported that the mechanism by which isothiocyanates (ITC) will inhibit the fungi growth is still unknown. However, some hypotheses suggest that it is due to a non-specific and irreversible interaction between the ITC and sulfhydryl groups, disulphide bonds and amino groups of proteins and amino acid residues. The main goal of toxic lipophilic compounds in eukaryotic cells is the cell membrane. (ITC) is a lipophilic compound, which can react with other enzymes present in the plasma level of the membrane causing growth, inhibition and cell death.

Based on the above results obtained in this study, it is possible an optimal control of *A. alternata* by inhibiting its

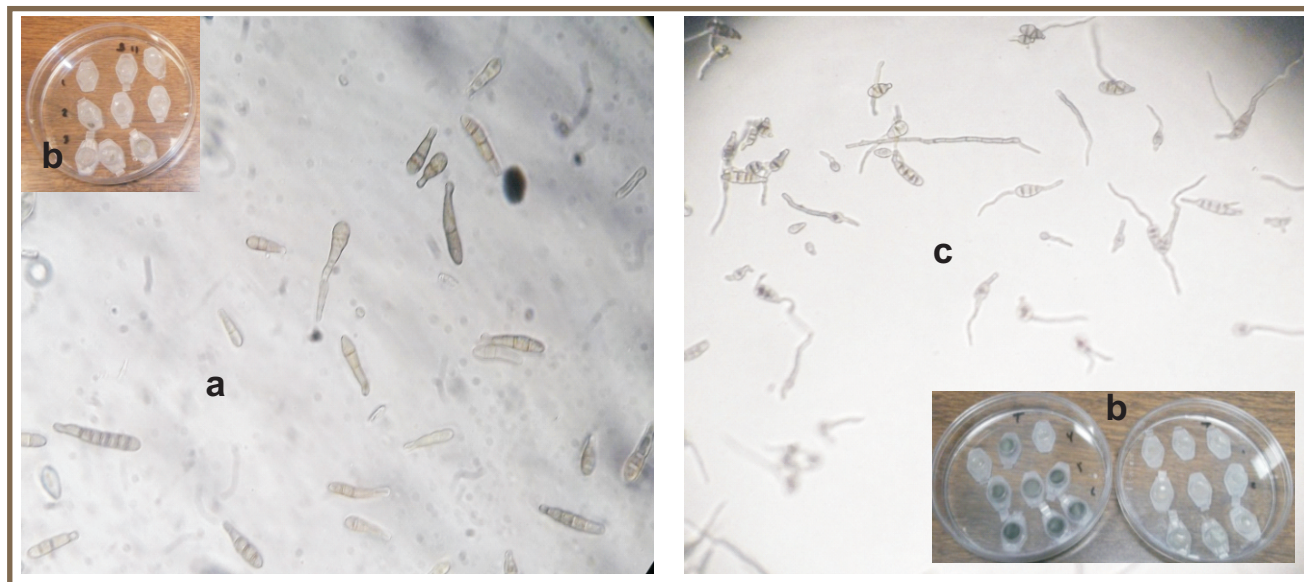


Figura 2. Efecto de Glucosinolatos (jugo de brócoli) en la inhibición de *Alternaria alternata* a) Esporas de *Alternaria* en PDA a las 6 h con una concentración de 0.15 µg/µL; b) crecimiento del hongo a los 3 d, solo o con diferentes concentraciones de jugo de brócoli; c) Esporas de *Alternaria alternata* en PDA a las 6 h (testigo).

Figure 2. Broccoli juice effect on the inhibition of germination of *Alternaria alternata* a) germination of conidia at 6 h with a concentration of glucosinolates 0.15 µg/µL b) growth of the fungus after 3 d, alone or with different concentrations of broccoli juice. c) Germination of *A. alternata* conidia of on PDA at 6 h (control).

El efecto inhibitorio de los GLs sobre la germinación de conidios de hongos fitopatógenos, ha sido observado por Vargas-Arispuro *et al.* (2005) quienes probaron extractos crudos de *Brassica oleracea* y reportan 100 % de inhibición en el crecimiento de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert a una concentración de 10 mg mL⁻¹.

Otro ejemplo del potencial fungicida del género *Brassica* spp. se ha comprobado en estudios *in vitro*, con extractos acuosos de nabo o colinabo, los cuales inhibieron completamente el crecimiento de oosporas de *Aphanomyces euteiches*, así como sustancias volátiles de plantas de *Brassica rapa* que inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a una concentración de 20 mg/g⁻¹ (Masahiro *et al.*, 2006).

Brandi *et al.* (2006) utilizando jugo de *Brassica oleracea* reportan que la efectividad antimicrobiana se debe a un mecanismo de acción a través del bloqueo de los grupos sulfhidrilo en bacterias. Por otro lado, Delaquis y Mazza (1995), aluden que el efecto se debe a una inactivación de enzimas intracelulares, a través de la escisión oxidativa de enlaces de disulfuro. Así mismo, Kojima *et al.* (1971), Banks *et al.* (1986) y Troncoso-rojas *et al.* (2005), comentaron que el mecanismo por el cual los isotiocianatos (ITC) inhiben el crecimiento de hongos aún se desconoce. Sin embargo, algunas hipótesis sugieren que se debe a una no específica e irreversible interacción de ITC con los grupos sulfhidrilo, enlaces de disulfuro y grupos amino de las proteínas y los residuos de aminoácidos. El principal objetivo de compuestos lipófilos tóxicos en células eucariotas es la membrana celular, el (ITC) es un compuesto lipófilo, que puede reaccionar con otras enzimas presentes en el nivel del plasma de la membrana causando el crecimiento, inhibición y muerte celular.

Basado en lo anterior los resultados obtenidos en este estudio, muestran un óptimo control de *A. alternata* al inhibir su reproducción, además de ser biodegradable no producen un desequilibrio al ecosistema y por su origen vegetal desarrollará una resistencia lenta con respecto a los insecticidas sintéticos (Chirinos, 2009).

Por consiguiente el jugo de brócoli con contenido de GLs posee un potencial antifúngico y podría ser usado como tratamiento preventivo en la producción de arúgula o en postcosecha, con el fin de disminuir los daños causados por *A. alternata*.

CONCLUSIONES

El jugo de brócoli a una concentración de 0.07 µg/µL inhibió la germinación de conidios de *Alternaria alternata*, este método de control natural se puede considerar para el manejo de la enfermedad en campo y postcosecha.

LITERATURACITADA

Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. New York, USA. 922p.
 Andersen B, Kroger E and Roberts G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105:291-299.

reproduction, besides being biodegradable (not producing an imbalance to the ecosystem) and because of its nature, the plant will develop a slow resistance to synthetic insecticides (Chirinos, 2009).

Therefore, broccoli juice with high GLs content possesses a high antifungal potential and it could be used as a preventive treatment in the arugula production or in post-harvest, in order to decrease the damage caused by *A. alternata*.

CONCLUSIONS

Broccoli juice at 0.07 µg/µL concentration inhibited conidia of *Alternaria alternata* germination; this natural control method can be considered for management of the disease in the field and during postharvest.

Báez-Flores ME, Troncoso-Rojas R y Tiznado-Hernández ME. 2008. Respuestas genéticas provocadas por el tratamiento con Isiocianatos en hongos del género *Alternaria*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:61-68.
 Banks JG, Board RG and Sparks, NH. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 8:103-107.
 Barillari J, Canistro D, Paolini M, Ferroni F, Pedulli GF, Iori R and Valgimigli L. 2005. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2475-2482.
 Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. APS Press. Minnesota, USA. 210p.
 Bautista-Baños S, Hernández-López M and Barrera-Necha L. 2000. Antifungal Screening of plants of the State of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:36-41.
 Brandi G, Amagliani G, Schiavano GF, De Santi M and Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 9:2274-2279.
 Campas-Baypoli ON, Bueno-Solano C, Martínez-Ibarra DM, Camacho-Gil F, Villa-Lerma AG, Rodríguez-Núñez JR, López-Cervantes J y Sánchez-Machado DI. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfenil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59:95-100.
 Carrillo L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta. Cuarta edición. 130p.
 Chirinos J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. *INIA Divulga* 14:40-42.
 Delaquis PJ and Mazza G. 1995. Antimicrobial properties of isothiocyanates in Food Preservation. *Food Technology*. Edited by James Giese, Associate Editor. 73-84p.
 Durazzo A, Azzini E, Lazzé MC, Raguzzini A, Pizzala R and Maiani G. 2003. Italian Wild Rocket (*Diplomatix*

- Tenuifolia* (L) DC.): influence of agricultural practices on antioxidant molecules and on cytotoxicity and antiproliferative effects. *Agriculture* 3:285-298.
- Ellis MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Cambrian Printers, Aberystwyth, Dyfed U.K. 465p.
- Ferrato J, Firpo I, Ortiz MM, Rotondo R y Beltrán C. 2012. Pérdidas poscosecha de hortalizas en negocios minoristas, con distintos sistemas de manejo, en Rosario, Santa Fe, Argentina. *Asociación Argentina de Horticultura* 31:21-27.
- Fraire-Cordero ML, Nieto-Ángel D y Cárdenas-Soriano E. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición de florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:25-33.
- García IE, Gago CL y Fernández NJL. 2006. Tecnología del Envasado en Atmósfera Protectora. Dirección General de Universidades e Investigación. CIEM. Madrid. 141p.
- Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahashiri F and Sekawi Z. 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal* 5:96-106.
- Hang KK and Fleming HP. 1994. Antibacterial activity of cabbage juice against lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 59:125-129.
- Jezeq J, Barry G, Haggett D, Atkinson A and Rawson DM. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47:4669-4674.
- Kader AA. 2007. Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas. Tercera edición. UCANR. Davis California. 580p.
- Kojima M and Oawa K. 1971. Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I) Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. *Journal of Fermentation Technology* 49:740-746.
- Koukounaras A, Siomos AS and Sfakiotakis E. 2010. Effects of 6-Ba Treatments on yellowing and quality of stored rocket (*Eruca sativa* Mill) Leaves. *Journal of Food Quality* 33:768-779.
- López SE y Cabral D. 1999. *Alternaria*. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Ciudad Universitaria Buenos Aires Argentina Academic Press. 42-47p.
- Mari M, Leoni O, Bernardi R, Neri F and Palmieri S. 2008. Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. *Postharvest Biology and Technology* 47:61-67.
- Masahiro K, Andriantsoa R, Yoko O, Motoaki T, Hitoshi H and Ryo F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. *Phytopatology* 96:1372-1379.
- Mercado Vergnes D, Renard ME, Duveiller E and Maraite H. 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology* 55:485-493.
- Molina-Vargas LF y Bentura-Castellanos JU. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco isotiocianatos sobre *Rhizoctonia solani* Kühn AG-3. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)* 1:37-40.
- Mucete D, Borozan A, Radu F and Jianu I. 2006. Antibacterial activity of isothiocyanates, active principles in *Armoracia rusticana* roots (I). *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 2:443-452.
- Nidhi S, Muhammad HR, Stephen S, Mohan T, Vipin KB and Nat NVK. 2007. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. *Plant Science* 172:95-110.
- Oms-Oliu G, Aguiló-Aguayo I and Martín-Belloso O. 2006. Inhibition of browning on fresh-cut pear wedges by natural compounds. *Journal of Food Science* 71:216-224.
- Rotem Y. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American Phytopathological Society. 326p.
- Saccardo PA. 1877. *Fungi veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi*. Series VI. *Michelia* 1:1-72.
- Serdani M, Kang J, Andersen B and Crous P. 2002. Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106:561-569.
- Sisti M, Amagliani G and Brandi B. 2006. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. *Fitoterapia* 74:453-458.
- Thomma BPHJ. 2003. *Alternaria* spp. From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4:225-226.
- Tripathi P and Dubey NK. 2004: Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32:235-245.
- Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, Ruelas C and García HS. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434.
- Vargas-Arispuro I, Corrales-Maldonado C, Vallejo-Cohen S y Martínez-Téllez M. 2005. Correlación entre contenido de azufre y actividad antifúngica de variedades de *Brassica oleracea* L. para el control de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:320-322.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds). Academic Press, San Diego, CA. USA. 315-322p.