INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

(Protección y Producción Vegetal)

Aislamiento y sensibilidad a aceites esenciales de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert e histopatología de raíces infectadas de *Mangifera indica* L.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Francisco López Juan

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alfonso Vásquez López

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca Diciembre 2016

SIP-14

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 13 del mes de diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca** (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis de grado titulada: **Aislamiento y sensibilidad a aceites esenciales de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Henebert e histopatología de raíces infectadas de *Mangifera indica* L.**

Presentado por el alumno:

López	**Juan**	**Francisco**
Apellido paterno	materno	nombre(s)

Con registro: | B | 1 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 |

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***SU APROBACION DE LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA
Director de tesis

Dr. Alfonso Vasquez López

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dra. Luicita Lagunez Rivera

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

Dr. Gerardo Rodriguez Ortiz

El PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día **28 del mes Noviembre del año 2016,** el que suscribe **López Juan Francisco,** alumno del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B140022,** adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Alfonso Vásquez López y cede los derechos del trabajo titulado: "Aislamiento y sensibilidad a aceites esenciales de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert e histopatología de raíces infectadas de *Mangifera indica* L.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección e-mail: posgrado_oax@ipn.mx o JACIER16@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

López Juan Francisco

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

ÍNDICE

Páginas

ÍNDICE DE CUADROS …… i

ÍNDICE DE FIGURAS …….. ii

RESUMEN ……. iii

ABSTRACT …… iV

1. INTRODUCCIÓN ……... 1

2. OBJETIVOS …… 4

3. HIPÓTESIS …….. 4

4. REVISIÓN DE LITERATURA ……. 5

4.1 El mango (*Mangifera indica* L.) …….. 5

4.2 Importancia económica del mango …….. 5

4.3 Principales enfermedades del mango …….. 6

4.4 Pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) …… 6

4.5 Importancia de *Phymatotrichopsis omnivora* en cultivos agrícolas …… 8

4.6 Histopatología de *Phymatotrichopsis omnivora* ……..… 8

4.7 Control de *Phymatotrichopsis omnivora* ……. 9

4.8 Aceites esenciales …… 10

4.9 Importancia de los aceites esenciales …….. 10

4.10 Método de extracción de los aceites esenciales ……. 11

5. MATERIALES Y MÉTODOS ……... 13

5.1 Aislamiento de *P. omnivora* (Experimento 1) ……... 13

5.1.1 Colecta de las muestras ……..….. 13

5.1.2 Purificación y preservación de *P. omnivora* …… 17

5.1.3 Identificación del fitopatógeno ……. 18

5.1.3.1 Caracterización morfológica ……. 18

5.1.3.2 Caracterización molecular ……. 19

5.1.3.2.1 Extracción de ADN ……..... 19

5.1.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) …… 21

5.2 Histopatología (Experimento 2) ……. 22

5.2.1 Preparación de muestras para cortes histológicos ……..... 22

5.3 Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales (Experimento 3) …… 23
5.3.1 Extracción de aceites esenciales …….…….. 23
5.3.2 Actividad antifúngica de los aceites esenciales …..…… 24
5.3.3 Análisis estadístico …….……... 26
6. RESULTADOS …… 27
6.1 Aislamiento de *P. omnivora* (Experimento 1) ….…….……... 27
6.1.1 Identificación del fitopatógeno …… 28
6.1.1.1 Caracterización morfológica …….…… 28
6.1.1.2 Caracterización molecular …….…… 29
6.2 Histopatología (Experimento 2) …….…… 31
6.3 Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales (Experimento 3) ……..... 33
6.3.1 Capacidad antifúngica de aceites esenciales que mostraron un porcentaje de inhibición menor al 100% a concentraciones de 100, 250, 500 y 100 μL L^{-1} 35
7. DISCUSIÓN …… 37
7.1 Aislamiento de *P. omnivora* …….……... 37
7.2 Histopatología …….…… 38
7.3 Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales ….……... 38
8. CONCLUSIONES ……... 40
9. LITERATURA CITADA …… 41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Aceites esenciales con actividad antifúngica reportada ……	**12**
2	Medios de cultivos evaluados para aislar a *P. omnivora* a partir de raíces de árboles de mango con síntomas de pudrición texana……	**14**
3	Tratamientos establecidos para evaluar el efecto de cuatro concentraciones (100, 250, 500 y 1000 $\mu L.L^{-1}$) de nueve aceites esenciales sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. omnivora* en condiciones *in vitro*. Se incluyó un fungicida comercial de contacto y un testigo……..	**25**
4	Porcentaje de aislamiento de *P. omnivora* obtenido en cada medio de cultivo evaluado ……..…….	**27**
5	Análisis de varianza de medidas repetidas de los tratamientos ……	**34**
6	Porcentaje de inhibición y desviación estándar del crecimiento micelial de *P. omnivora* trtado con cuatro dosis de nueve aceites esenciales vegetales ...….	**34**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Árboles de mango con síntomas de pudrición texana. …….	15
2	Proceso de aislamiento de *Phymatotrichopsis omnivora*. ..……..	16
3	Aislamiento de *P. omnivora* a partir de esclerocios…….	17
4	Purificación y preservación del hongo ……	18
5	Proceso de extracción de ADN ……..	20
6	Reacción en Cadena de la Polimerasa ……..	21
7	Proceso de extracción de aceites esenciales ……...	24
8	Preparación del medio de cultivo PDA + aceites esenciales ……	26
9	Signos fungosos en raíces de mango infectadas ……..	28
10	Estructuras de *P. omnivora* desarrolladas en medio del cultivo PDA ……...	29
11	Estructuras fungosas sobre la superficie de raíces de árboles de mango sintomáticos…….....	30
12	Cortes transversales de raíces enfermas observadas con el Microscopio Electrónico de Barrido……..	31
13	Cortes transversales de raíz enferma y sana ……	32
14	Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare, Lippia alba, Eucalyptus citriodora, Coriandrum sativum, Allium sativum* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de 250 $\mu L.L^{-1}$en un periodo de 15 días……	35
15	Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare, Lippia alba, Eucalyptus citriodora* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de 250 $\mu L.L^{-1}$en un periodo de 15 días …….	35
16	Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare, Lippia alba, Eucalyptus citriodora* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P. omnivora* a una concentración de 500 $\mu L.L^{-1}$en un periodo de 15 días ……..	36
17	Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de 1000 $\mu L.L^{-1}$ en un periodo de 15 días ……...	36

RESUMEN

En el estado de Oaxaca, la producción de mango (*Mangifera indica* L.) disminuye significativamente por problemas fitosanitarios. En la región del Istmo de Tehuantepec, Oax., los árboles de mango var. Ataulfo de entre 3 y 6 años de edad son afectados por una enfermedad fungosa de importancia económica conocida como "pudrición texana o pudrición de raíz" que reduce la productividad de los huertos comerciales. Los árboles afectados mostraron marchitez del follaje y frutos, inicialmente las hojas adquirieron un color verde pálido; en un estado avanzado de la enfermedad las hojas se tornaron de color café-bronce; las hojas y los frutos permanecieron adheridos al árbol; los árboles sintomáticos finalmente murieron. Las raíces infectadas exhibieron pudrición y fragmentación del tejido cortical con presencia de cordones miceliales de color blanco (cordones jóvenes) y color amarillo-café (cordones maduros) que se extendieron de forma longitudinal y transversal en las raíces. En este estudio, el hongo se aisló de raíces de árboles de mango *var.* Ataulfo de 4 años de edad a partir de cordones miceliales de color blanco en medio de cultivo agar-dextrosa-papa sin y con antibióticos (Sulfato de estreptomicina®, Cloranfenicol® y Ampicilina® a 100 $mg.L^{-1}$). El crecimiento micelial inició después de 5 días. El hongo no se pudo aislar a partir de cordones miceliales de color amarillo-café. De acuerdo a sus características morfológicas y moleculares se determinó que los cordones miceliales fueron de *Phymatotrichopsis omnivora*. Los estudios histológicos revelaron que las raíces de árboles de mango infectadas por *P. omnivora* sufrieron invasión y lisis de las células de la peridermis, floema y células acompañantes. En el tejido de la endodermis se observó lisis, fragmentación y lignificación de las paredes celulares. No se observó afectación del tejido del xilema ni de la médula. Por otra parte se evaluó el efecto antifúngico de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus, Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Lippia alba, Mentha piperita, Eucalyptus citriodora, Coriandrum sativum Allium sativum y Syzygium aromaticum* a concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 $\mu L.L^{-1}$, en condiciones *in vitro.* La extracción de los aceites se realizó mediante la técnica de hidrodestilación asistida con microondas. El crecimiento micelial de *P. omnivora* se inhibió en 100% por el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus, Thymus vulgaris, y Syzygium aromaticum* a partir de una concentración de 100 $\mu L\ L^{-1}$; *Coriandrum sativum y Allium sativum* lo hicieron a partir de 250 $\mu L.L^{-1}$, *Mentha piperita* a partir de 500 $\mu L.L^{-1}$ y *Eucalyptus citriodora y Lippia alba* a partir de 1000 $\mu L.L^{-1}$. El aceite esencial de *Origanum vulgare* y el azufre elemental inhibieron el 95 y 71% del crecimiento micelial respectivamente a 1000 $\mu L.L^{-1}$.

Palabras clave: Aceites esenciales, Histopatología, *Mangifera indica* L., *Phymatotrichopsis omnivora* y pudrición texana,

ABSTRACT

Oaxaca state ranks fourth as a mango producer nationwide. However the crop is susceptible to a disease of economic importance known as "Phymatotrichum (cotton or Texas) root rot" that reduces the productivity of commercial orchards. The typical symptoms of the disease are wilting of the leaves and fruits, initially the leaves acquire a pale green color; In an advanced state of the disease the leaves turn brown; Both leaves and fruits without abscission. The infected roots exhibit decay and fragmentation of the cortical tissue with the presence of white mycelial strands (young mycelial strands) and yellow-brown color (mature mycelial strands) that extend longitudinally and transversally in the roots. The fungus was isolated from roots of mango trees var Ataulfo from 4-year-old white mycelial strands in agar-dextrose-potato medium with and without antibiotics (Streptomycin Sulfate, Chloramphenicol and Ampicillin at 100 mg / l). Mycelial growth was appreciated at 5 days. The fungus could not be isolated from yellow-brown mycelial strands. According to their morphological and molecular characteristics it was determined that the mycelial strands were of *Phymatotrichopsis omnivora*. Histological studies revealed that the roots of mango trees infected by *P. omnivora* suffered invasion and lysis of the cells of the peridermis, phloem and companion cells. The tissue of the endodermis were observed, cell death, fragmentation and lignification of the cell walls. No involvement of the xylem and marrow tissue was observed. On the other hand, the antifungal effect of the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Lippia alba*, Mentha piperita, *Eucalyptus citriodora*, *Coriandrum sativum*, *Allium sativum* and *Syzygium aromaticum* was evaluate at concentrations of 100, 250, 500, and 1000 µL .L-1, under *in vitro* conditions. The extraction of the oils was carried out using the technique of hydrodistillation assisted with microwaves. Mycelial growth of *P. omnivora* was inhibited 100% by the effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, and *Syzygium aromaticum* from a concentration of 100 µL L^{-1}; *Coriandrum sativum* and *Allium sativum* made it from 250 µL.L^{-1}, *Mentha piperita* from 500 µL.L^{-1} finally *Eucalyptus citriodora* and *Lippia alba* to 1000 µL.L^{-1}. *Origanum vulgare* essential oil and elemental sulfur inhibited 95 and 71% of the mycelial growth respectively at 1000 µL.L-1.

Key words: Essential oils, Histopathology, *Mangifera indica* L., *Phymatotrichopsis omnivora* y Texan root rot.

1. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es originario de Asia, en el año 2013 México ocupó el quinto lugar como productor de mango a nivel mundial, mientras que Oaxaca ocupó el séptimo lugar como productor a nivel nacional (SIAP 2014). El cultivo de mango es susceptible a la pudrición texana cuyo agente causal es *Phymatotrichopsis omnivora.* Los síntomas típicos de la enfermedad son marchitez de la planta, coloración verde limón y muerte, mostrando finalmente las hojas secas que permanecen fijas por un tiempo (Noriega *et al.,* 2012.) El patógeno está distribuido al norte de México y sur de Estados Unidos, adaptado a suelos con bajo contenido de materia orgánica (1%), un pH mayor a 7 (Lyda, 1978) y temperatura óptima de 28 °C. Puede atacar a más de 2000 especies de plantas (Todd *et al.,* 2007 y Cervantes-Martínez *et al.,* 2010).

Dentro de los principales cultivos afectados se encuentran algodón, nogal, pistachero, manzano y durazno. En esas especies las pérdidas causadas por esta enfermedad son considerables; en manzano, por ejemplo, la mortandad anual en huertos con esta enfermedad es aproximadamente del 30% (Kenerley *et al* 1994), mientras que en nogal en la Comarca lagunera se encontró una incidencia de 10.5% lo que representa pérdidas equivalentes a 12 millones de pesos (Herrera y Samaniego, 2002).

El hongo comúnmente sobrevive durante el invierno por esclerocios y cordones miceliales en las raíces de las plantas (Lyda, 1978). El daño en la raíz según lo reporta Uppalapati *et al.,* (2009) en un estudio con raíces de *Medicago truncatula* infectadas con *P. omnivora,* es

ocasionado por la hifa infectiva que no forma alguna estructura específica de penetración, y que coloniza principalmente las células corticales, formando por último un manto micelial que cubre la superficie de las raíces. Estudios referidos a la resistencia de las plantas a los organismos patógenos sugieren que el nivel de tolerancia o los mecanismos que inhiben el desarrollo de la enfermedad están determinados por la especie vegetal y el estado fenológico de la misma (Sepúlveda *et al.*, 2003, ; Arias *et al.*, 2011). La resistencia está dada por las barreras estructurales y químicas que ofrece la planta, lo cual representa mecanismos de defensa constitutivos e inducidos. Estos últimos representan los cambios en las estructuras morfológicas y variaciones en la composición y/o concentración de compuestos químicos (Ringuelet y Viña, 2013).

Investigaciones recientes han centrado su estudio en la búsqueda de medidas que permitan tener un control de la enfermedad, tales como: la capacidad de la harina de semillas de *Brassica funcea* L. a 1.0, 5.0% (w/w) en la inhibición del crecimiento de hifas y la germinación de esclerocios *in vitro* (Hu *et al.*, 2011), el efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios expuestos a Tilt (propiconazol) y *Trichoderma* sp (Samaniego-Gaxiola 2008), prácticas culturales que consisten en la eliminación de plantas y la construcción de zanjas entre árboles en las zonas donde es detectado el patógeno, con el fin de limitar su desarrollo en ausencia de su hospedante (Todd *et al.*, 2007), control biológico usando organismos antagónicos como *Trichoderma* spp. que reducen en cierto grado el daño que ocasiona *P. omnivora* (Cervantes-Martínez *et al*., 2010)*;* aplicación de Arilselenofosfatos con acción antifúngica selectiva (Vargas-Arispuro y Contreras, 2006).

El uso de aceites esenciales de plantas es otra estrategia de control que ha sido probada contra diferentes patógenos (Cuadro 1). Los aceites esenciales son fracciones liquidas, volátiles, generalmente mezclas homogéneas de hasta 100 moléculas (Rodríguez *et al.*, 2012) producto del metabolismo secundario de algunas especies vegetales. Se componen de moléculas de bajo y mediano peso molecular, generados en la planta por varias rutas biosintéticas, pertenecen a diferentes grupos químicos, como alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles y terpenos, entre otros (Stashenko, 2009).

Bajo condiciones de temperatura ambiental, son líquidos poco densos pero con mayor viscosidad que el agua, sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, son solubles en los disolventes orgánicos comunes, casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoniaco) (Rodríguez *et al.*, 2012).

En esta investigación se plantea el uso de aceites esenciales como una alternativa de control, estudiando la capacidad de los aceites esenciales de diferentes plantas para inhibir el desarrollo de *P. omnivora* en condiciones *in vitro,* la cual ha sido probada en diferentes fitopatógenos, así también realizar cortes histológicos de raíces de *Mangifera indica* L. para analizar los cambios anatómicos, como respuesta a los estímulos generados por el patógeno.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el uso de antibióticos en el aislamiento de *Phymatotrichopsis omnivora* además del efecto de nueve aceites esenciales en el crecimiento micelial y describir los cambios anatómicos en raíces de mango infectadas.

Objetivos específicos

- Evaluar medios de cultivo con y sin antibióticos para el aislamiento de *P. omnivora*
- Describir los cambios anatómicos a nivel celular inducidos por *P. omnivora* en raíces de árboles de mango de 6 años de edad en San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.
- Evaluar la inhibición (%) del crecimiento micelial de *P. omnivora, in vitro,* por efecto de nueve aceites esenciales.

3. HIPÓTESIS

- El aislamiento de *P. omnivora* no depende del uso de antibióticos sin embargo el estado de madurez del cordón micelial es crucial para este proceso.
- El mecanismo de penetración de *P. omnivora* en mango es igual al reportado para *Medicago truncatula.*
- Al menos 1 de los 9 aceites esenciales evaluados presentará efectividad antifúngica sobre el crecimiento micelial de *P. omnivora* en condiciones *in vitro.*

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. El mango (*Mangifera indica* L.)

El mango perteneciente a la familia Anacardiaceae está distribuido en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo desde el nivel del mar hasta los 1200 msnm; por lo general las variedades comerciales se cultivan por debajo de los 600 msnm. El árbol del mango es tolerante a una amplia gama de condiciones edáficas, el pH óptimo para su desarrollo es de 5.5 a 7.5 (Bally 2006) y puede vivir por más de 100 años. En huertos comerciales, la altura máxima de crecimiento es de 10 m mientras que en condiciones de vida libre puede alcanzar alturas entre 20-30 m. El mango tiene una raíz que normalmente supera el diámetro de la copa, la distribución de las raíces de absorción cambia según la temporada con la distribución de la humedad en el suelo.

4.2. Importancia económica del mango

El mango es apreciado principalmente por sus frutos los cuales son diferentes dependiendo de la variedad, puede consumirse como fruta inmadura, trozos en salmuera, trozos en almíbar, pulpa, néctar, jugos, jalea y mermeladas. Los principales países productores del mundo son India con 12, 342, 891 t; China con 3, 362, 210 t; China Mainland con 3,172,857 t, Tailandia con 1,889,665 t y México con 1,564,871 t (FAOSTAT 2013). En el territorio nacional, el estado de Guerrero encabeza la producción con 364,317 t le sigue Chiapas con 196,166 t, Nayarit con 175,210 t y Oaxaca con 160,704 t (SIAP 2014).

4.3. Principales enfermedades del mango

Como todo cultivo, el rendimiento en la producción del mango se ve condicionado principalmente por las enfermedades, las de mayor relevancia son antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. In Penz - *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaud. & Schrenk) y (*Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds); Muerte regresiva (*Botryosphaeria disrupta* (Berk. & M.A. Curtis) Arx & E. Müller); (*Botryosphaeria quercuum* (Schwein.) Sacc.); (*Botryosphaeria rhodina* (Cooke) Arx - *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.); Escoba de bruja (*Fusarium* subglutinans (Wollenweb. & Reinking); Cenicilla (*Oidium asteris-punicei* Peck) y (*Oidium mangiferae* Berthet); Pudrición texana o pudrición de raíz (*Cylindrocladiella peruviana* (Batista, Bezerra & Herrera) Boesewinkel); (*Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert); (*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan); (*Phytophthora palmivora* (E. J. Butler) E. J. Butler); *Pythium* spp.); (*Pythium splendens* H. Braun); (*Rhizoctonia solani* Kühn) y (*Sclerotium rolfsii* Sacc. var. delphinii (Welch) Boerema & Hamers) (APS, 2016).

4.4. Pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnivora*)

El cultivo de mango es susceptible a *Phymatotrichopsis omnivora* que causa la pudrición de la raíz y como consecuencia la muerte de la planta, los síntomas comunes son en un inicio que la planta pierde turgencia, posteriormente las hojas se tornan cloróticas y por último se secan sin abscisión (Noriega *et al.*, 2012.) El agente causal *Phymatotrichopsis omnivora* es un hongo del cual se desconoce fase sexual, recientes estudios filogenéticos han permitido ubicarlo en la división Ascomycota y orden Pezizales, este fitopatógeno se encuentra

distribuido al norte de México y sur de Estados Unidos afectando un amplio grupo de hospedantes, se estima que alrededor de 2000 especies de dicotiledóneas tanto silvestres como cultivadas son susceptibles, hasta el momento no hay reporte de que alguna monocotiledónea sea afectada, este patógeno está adaptado a suelos con pH alcalino (pH<7) y regiones tropicales con temperaturas alrededor de los 28 °C (Todd *et al.,* 2007 y Cervantes-Martínez *et al*., 2010).

El hongo normalmente sobrevive durante el invierno debido a que forma estructuras de resistencia tales como esclerocios y cordones miceliales (rizomorfos) en la superficie de las raíces (Lyda, 1987). Los esclerocios han sido encontrados a diferentes profundidades, algunas veces a más de 2 m (Samaniego, 2003); sin embargo a los 90 cm se puede encontrar una cantidad mayor, además se sabe que pueden sobrevivir aún después de 20 años en el suelo (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Los cordones miceliales conservan su viabilidad hasta por un año, pueden crecer en el suelo pequeñas distancias cuando el sistema radical no está presente (Lyda, 1978). El micelio presenta estructuras en forma de crucetas, característica típica del género, útil para la identificación morfológica, *P. omnívora*; tiene una fase conidial, después del periodo lluvioso forma masas de esporas en la superficie del suelo, hasta la fecha la germinación de las esporas ha sido raramente observada y el rol de los conidios en el ciclo de vida de este patógeno aun es desconocido (Uppalapati *et al.,* 2010).

4.5. Importancia de *Phymatotrichopsis omnivora* en cultivos agrícolas

Dentro de los principales cultivos afectados se encuentran el algodón, nogal, pistachero, manzano y durazno donde las pérdidas causadas por esta enfermedad son considerables, en manzano por ejemplo, la mortandad anual en huertos con esta enfermedad es aproximadamente del 30 % (Kenerley *et al.*, 1994), mientras que en nogal en la Comarca lagunera se encontró una incidencia de 10.5% lo que representa pérdidas equivalentes a 12 millones de pesos (Herrera y Samaniego, 2002), en el caso del pistachero se ha dejado de producir en regiones donde el hongo está presente, por el momento no se tiene una estrategia que permita un manejo de la enfermedad a fin de aumentar el rendimiento en regiones afectadas por esta (Samaniego, 2003).

4.6. Histopatología de *Phymatotrichopsis omnivora*

La histopatología explica la especificidad de las interacciones entre el huésped y el patógeno, que desembocan en una relación compatible (o de susceptibilidad) o incompatible (o de resistencia). Se trata de obtener información sobre los cambios a nivel celular que tienen lugar en el huésped. El enfoque fisiológico permite además analizar con detalles los distintos mecanismos ofensivos en el patógeno y defensivos en el huésped y su papel en el desarrollo de la enfermedad (Whitham, *et al.*, 1994). En el caso de *P. omnivora*, un estudio en raíces de *Medicago truncatula* infectadas reportó que la hifa infectiva no formó alguna estructura específica de penetración, colonizó principalmente las células corticales y por ultimo formó un manto micelial que cubrió la superficie de las raíces (Uppalapati *et al.*, 2010). Por otro lado los estudios referidos a la resistencia de las plantas a los organismos patógenos sugieren que el nivel de tolerancia o los mecanismos que inhiben

el desarrollo de la enfermedad están determinados por la especie vegetal y el estado fenológico de la misma (Sepúlveda *et al.*, 2003, Arias *et al.*, 2011). La resistencia está dada por las barreras estructurales y químicas que ofrece la planta, lo cual representa mecanismos de defensa constitutivos (están presentes en la planta aun en ausencia del patógeno) e inducidos, estos últimos representan los cambios en las estructuras morfológicas y variaciones en la composición y/o concentración de compuestos químicos (Ringuelet y Viña, 2013).

4.7. Control de *Phymatotrichopsis omnivora*

Actualmente se tiene registro de investigaciones enfocados al control de *Phymatotrichopsis omnivora* haciendo uso de fungicidas efectivos pero con un costo que limita el acceso a los mismos, así también la incorporación de organismos antagonistas como *Trichoderma* spp. que resulta efectivo en la inhibición de la germinación de esclerocios (Cervantes-Martínez *et al.*, 2010), también se demostró la efectividad de la harina de semillas de *Brassica funcea* L. a 1.0 y 5.0% (w/w) en la inhibición del crecimiento de hifas y la germinación de esclerocios *in vitro* (Hu *et al.*, 2011) de la misma forma se demostró que los compuestos arilselenofosfatos cíclicos inhibieron entre el 10 y 100% el crecimiento de cordones miceliales del hongo (Vargas-Arispuro y Contreras, 2006), cada estudio proporciona alternativas que pueden reducir los daños generados por *Phymatotrichopsis omnivora*.

4.8. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una estrategia más que se plantea para el manejo de la enfermedad, son fracciones liquidas volátiles, generalmente mezclas homogéneas de hasta 100 compuestos químicos orgánicos (Rodríguez *et al.*, 2012) son producto del metabolismo secundario de algunas especies vegetales, moléculas de bajo y mediano peso molecular, generados en la planta por varias rutas biosintéticas, pertenecen a diferentes clases de sustancias químicas, por ejemplo: alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles y terpenos, entre muchas otras (Stashenko, 2009) además poseen efecto anti fúngico (Javed *et al.*, 2012).

A temperatura ambiente, son líquidos poco densos pero con mayor viscosidad que el agua, sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, son solubles en los disolventes orgánicos comunes, casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoniaco) (Rodríguez *et al.*, 2012).

4.9. Importancia de los aceites esenciales

La importancia de los aceites esenciales radica en su potencial para ser usados en el sector industrial, agrícola y en la elaboración de fármacos (Stashenko, 2009; Rodríguez *et al.*, 2012).

En la agricultura son usados como fungicidas (Cuadro 1), bactericidas y para el control de plagas. La composición de un aceite esencial depende de la especie vegetal de donde se extrae y el estado fenológico de ésta, por lo cual se desarrollan pruebas con diferentes aceites para el control de las enfermedades, por ejemplo, un estudio demostró que el aceite de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake posee un efecto antifúngico promisorio

frente a *Alternaria solani* Sor y *Fusarium* sp. y efecto antibacteriano frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) y por último es altamente toxico para los ácaros provocando un 100% de mortalidad en la hembras de *Tetranychus urticae* Koch, *Panonychus citri* y *Raoiella indica* Hirst y un 88.73% a las de *Tetranychus tumidus* Banks, así también los aceites de *Origanum vulgare* L. y *Monarda didyma* L. efecto inhibitorio del crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers (Adebayo *et al.*, 2013).

4.10. Método de extracción de los aceites esenciales

El método más empleado para extraer aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor de agua y consiste en depositar el material vegetal en un recipiente sin que entre en contacto con el agua y así conforme el vapor entra en contacto con la materia vegetal la calienta y va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es "arrastrado" corriente arriba hacia el tope del destilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador para enfriarse a temperatura ambiente. A la salida del condensador se obtiene una emulsión líquida inestable, la cual, es separada en un decantador dinámico o florentino (Rodríguez *et al*., 2012). Este método es eficiente y no se alteran las propiedades químicas del aceite esencial.

Cuadro 1.Aceites esenciales con actividad antifúngica reportada.

Planta	Patógeno	Referencia
Té limón (*Cymbopogon citratus*)	*Colletotrichum gloeosporioides*	Duarte *et al.*, 2010
Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*)	*Aspergillus flavus* *Aspergillus fumigatus* *Aspergillus nidulans*	Javed 2012
Menta (*Mentha piperita*)	*Rhizoctonia solani* *Macrophomina phaseolina*	Khaledi *et al* ., 2015
Tomillo (*Thymus vulgaris*)	*Alternaria alternata*	Perina *et al*., 2014
Ruda (*Ruta chalepensis*)	*Trichophyton rubrum y Candida albicans*	Khoury *et al*., 2014
Pitiona (*Lippia alba*)	*Moniliophthora roreri* *Aspergillus fumigatus* *Candida krusei*	Lozada *et al.*, 2012 Montiel *et al.*, 2007
Orégano (*Origanum vulgare*)	*Botrytis cinérea* Pers	Adebayo *et al.*, 2013

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamiento de *P. omnivora* (Experimento 1)

5.1.1. Colecta de las muestras

En el mes de mayo del 2015, en un huerto comercial de mango var. Ataulfo ubicado en la comunidad de San Francisco Ixhuatán (16°21'N, 94°28'O, 12 msnm) Oaxaca, se identificaron 10 árboles de mango de 4 años de edad con síntomas de pudrición texana. Los árboles enfermos se caracterizaron por presentar marchitez y secamiento de todo el follaje; las hojas se tornaron de color café-cobre con enrollamiento de márgenes y permanecieron adheridas al árbol al igual que los frutos. Las raíces enfermas presentaron pudrición y desprendimiento del tejido cortical con presencia de micelio de color amarillo y blanco, ambos de aspecto algodonoso, y cordones miceliales a lo largo de la superficie de las raíces (Figura 1).

De cada árbol se recolectaron 10 muestras de raíces enfermas de 3.0 cm de diámetro y de 10 cm de longitud a una profundidad de 50 – 100 cm. Así mismo, se colectó una muestra de 5.0 kg de suelo compuesta a partir de cinco submuestras de 1.0 kg de suelo tomadas de 5 árboles sintomáticos a una profundidad de 50-100 cm con el propósito de obtener esclerocios. Tanto las muestras de raíces como de suelo se guardaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca donde se mantuvieron en condiciones de refrigeración.

Del total de raíces muestreadas se tomaron 120 segmentos de cordones miceliales de aproximadamente 0.5 cm de longitud los cuales fueron lavados con agua, se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, después se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo (Figura 2) de acuerdo a los tratamientos indicados en el Cuadro 2.

El suelo colectado se homogeneizó, tamizó y lavo con agua corriente; obteniendo una muestra de 400 g de suelo húmedo con partículas de 1 a 2 mm de diámetro, los esclerocios fueron separados del resto de las partículas del mismo tamaño de forma manual. Los esclerocios se desinfestaron con hipoclorito de sodio a 3% por 10 minutos después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en cajas de Petri (Figura 3) conteniendo los medios de cultivo indicados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Medios de cultivos evaluados para aislar a *P. omnivora* a partir de raíces de árboles de mango con síntomas de pudrición texana.

Medio de cultivo	Muestra sembrada	No. de muestras
PDA + Sulfato de estreptomicina, Cloranfenicol y Ampicilina a 100 $mg.L^{-1}$	Cordón micelial de color amarillo	20
	Cordón micelial de color blanco	20
	Cordón micelial de color café	20
	Esclerocio	15
PDA	Cordón micelial de color amarillo	20
	Cordón micelial de color blanco	20
	Cordón micelial de color café	20
	Esclerocio	15

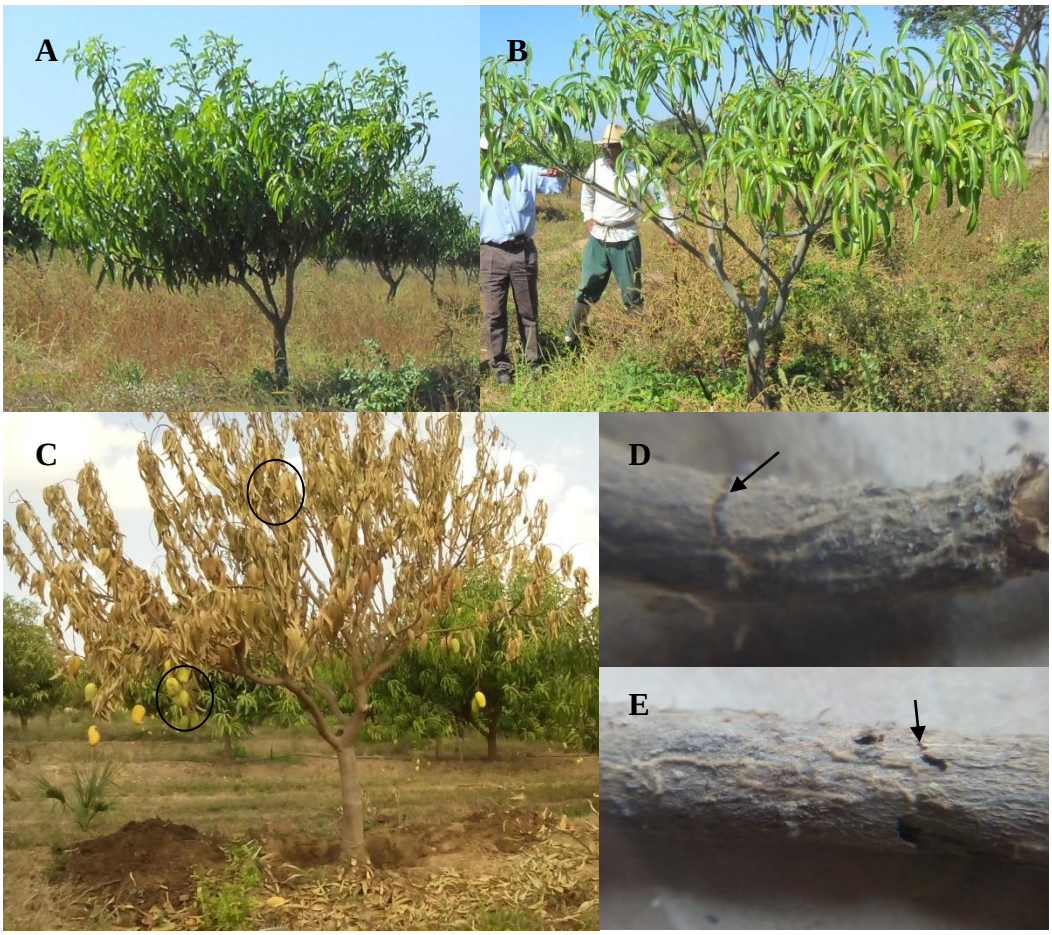

Fig. 1 **Árboles de mango con síntomas de pudrición texana**. A) Planta sana de 4 años de edad, B) Planta enferma con follaje clorótico y escaso, C) Planta con un grado avanzado de la enfermedad mostrando hojas secas de color cobre y frutos marchitos sin abscisión, D-E) Raíz con pudrición y desprendimiento del tejido de la corteza mostrando cordones miceliales de *Phymatotrichopsis omnivora*.

Fig.2 **Proceso de aislamiento de *Phymatotrichopsis omnivora*.** A) Recolección de raíces enfermas a partir de un árbol de mango var. Ataulfo de 4 años de edad a una profundidad de 50 cm. B-C) Toma de muestras de un cordón micelial. D) Desinfestación de segmentos de 0.5 cm de longitud de cordones miceliales con hipoclorito de sodio a 2% durante 3 min y enjuagados en agua destilada estéril. E) Siembra de segmentos de cordón micelial en medio de cultivo PDA.

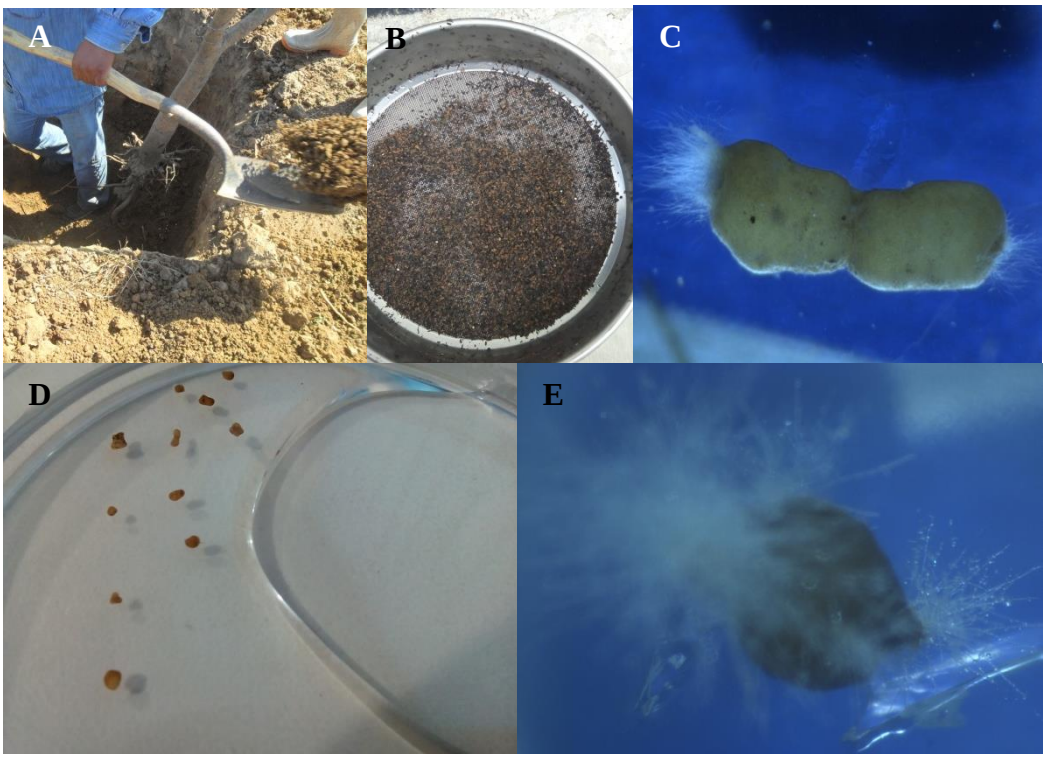

Fig. 3 **Aislamiento de *P. omnivora* a partir de esclerocios.** A) Recolecta de suelo a una profundidad de 50-100 cm. B) Suelo tamizado con tamaño de partícula de 1-2 mm. C) Esclerocios separados del suelo tamizado D) Desinfestación de esclerocios con hipoclorito de sodio a 3% durante 10 min y enjuagados en agua destilada estéril. E) Esclerocios sembrados en medio de cultivo PDA con y sin antibióticos: Sulfato de estreptomicina, Cloranfenicol y Ampicilina a 100 $mg.L^{-1}$

5.1.2. Purificación y preservación de *P. omnivora*

Las colonias desarrolladas en el medio de cultivo fueron purificadas por la técnica de punta de hifa y transferidas a medio de cultivo PDA sin antibióticos, se dejaron incubar a 22±3°C durante 10 días. El hongo puro se preservó dentro de tubos de ensaye conteniendo PDA y aceite mineral estéril. Sobre el PDA se colocó un disco micelial de 0.5 cm de diámetro y se incubó a 22±2°C con 12 h luz y 12 h oscuridad; una vez que el micelio cubrió la totalidad de la superficie del medio de cultivo, éste se cubrió con aceite mineral estéril (Figura 4).

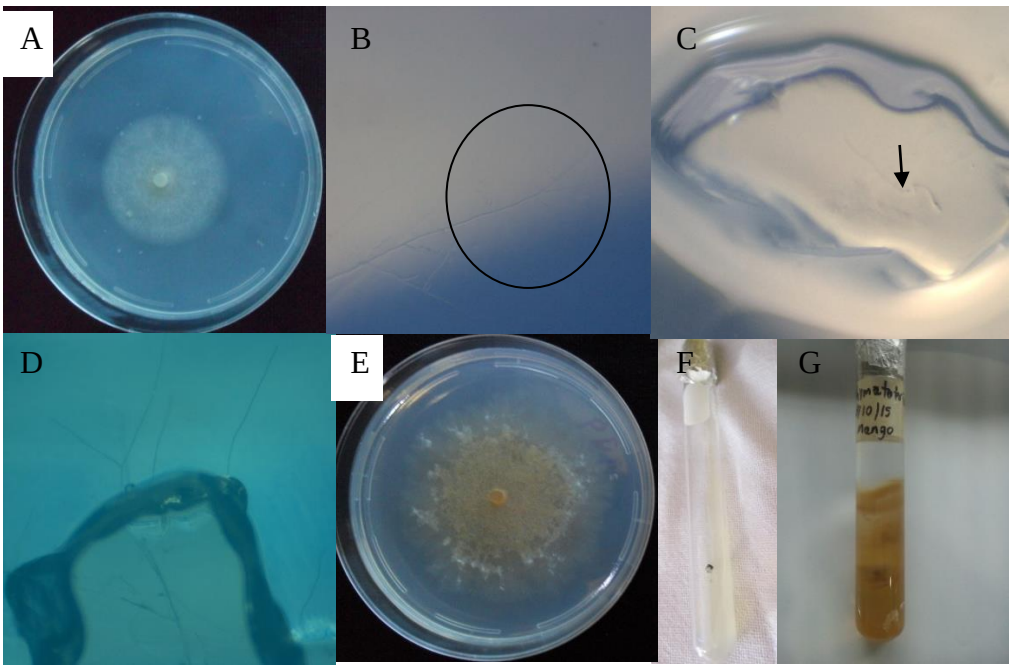

Fig. 4 **Purificación y preservación del hongo.** A) Colonia de *P. omnívora* en PDA de 10 días de edad. B-D) Identificación de la punta de una hifa. E) Colonia fungosa pura. F) Siembra de un disco micelial en PDA dentro de un tubo de ensayo. G) PDA totalmente cubierto por el micelio del hongo y cubierto con aceite mineral estéril.

5.1.3. Identificación del fitopatógeno

5.1.3.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó a partir de una colonia pura cultivada en PDA a 22±2 °C con 12 h luz y 12 h oscuridad por 30 días y siguiendo las claves taxonómicas para género de Barnett y Hunter (2006). Adicionalmente se tomaron microfotografías de segmentos de raíces de mango de 1.0 cm de longitud con cordones miceliales de *P. omnivora*; éstas se obtuvieron con un Microscopio Electrónico de Barrido modelo JSM-IT300LV (JEOL) ubicado en el laboratorio de técnicas no destructivas y análisis de materiales del CIIDIR-Oaxaca.

5.1.3.2. Caracterización molecular

5.1.3.2.1. Extracción de ADN

El ADN de *P. omnivora* se extrajo de micelio; éste se maceró durante 40 s en 300 µL de solución amortiguadora (SDS); el macerado se incubó a 65 °C en baño maría por 1 h, cada 10 minutos se mezcló con el Vortex, posteriormente se agregó 1 mL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), nuevamente se mezcló con el vortex y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm; el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 5.0 mL y se adicionaron 300 µL de cloroformo, se mezcló por 30 s con el vortex y centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos; el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 5.0 mL y se adicionaron 200 µL de isopropanol frio, se homogeneizó por inversión y el ADN se dejó precipitar durante 12 h; posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min, el sobrenadante se decantó y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min, finalmente se resuspendió en 500 µL de agua destilada estéril La integridad y calidad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% teñido con 1 µL de bromuro de etidio observado bajo luz ultravioleta(Figura 5).

Fig. 5 **Proceso de extracción de ADN.** A) Colecta del micelio a partir de una cepa pura cultivada en PDA y de 8 días de edad. B) Micelio macerado en solución amortiguadora (SDS). C) Incubación a 65°C en baño maría durante 1 h. D) precipitación de proteínas con 1.0 mL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1) y agitación con el vortex. E) Eliminación del fenol con 300 µL de cloroformo. F) Precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol frío. G) Calidad: electroforesis. H) Observación del gel.

5.1.3.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se elaboró una mezcla con un volumen final de 50 µL que contenía 3 µL de ADN, 29.9 µL de agua ultrapura estéril, 1.8 µL de cada primer: ITS4 e ITS5, 5 µL de10x tampón de PCR, 3.2 µL de $MgCl_2$, 0.3 µL de Platinum Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen ™) y 5 µL dNTP (Invitrogen ™). Se empleó un termociclador (MultiGene ™ OptiMax; Labnet international, Edison, NJ, EUA). Las condiciones de la PCR para ITS fueron: 95°C por 4 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s; 52°C por 30 s; 72°C por 45 s y 72°C por 10 min. La amplificación de las regiones ITS se evidenció en gel de Agarosa al 1.2% teñido con 1 µL de bromuro de etidio observado bajo luz ultravioleta (Figura 6). La purificación y secuenciamiento fue hecha por la empresa Macrogen Inc. Seul, Corea. La secuencia de nucleótidos fue editada utilizando el programa MEGA v. 5 (Staden Package), después la secuencia se comparó con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) usando el algoritmo BLAST para comparar las secuencias con el mayor grado de similitud con la secuencia obtenida en este estudio.

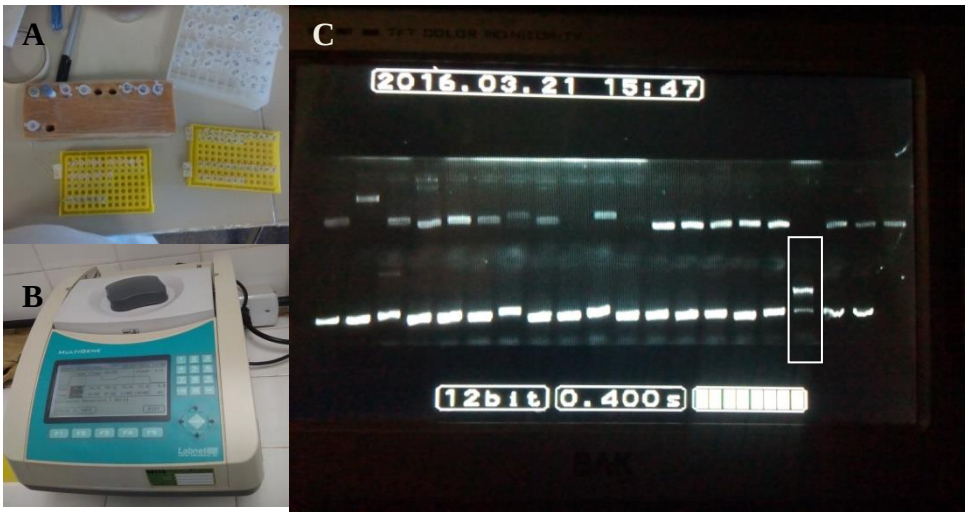

Fig. 6 **Reacción en Cadena de la Polimerasa**. A) Preparación de la mezcla par la PCR B) Amplificación de las regiones ITS en el termociclador C) Observación del gel.

5.2. Histopatología (Experimento 2)

5.2.1. Preparación de muestras para cortes histológicos

En campo se recolectaron 50 muestras de raíces de mango de 5.0 cm de diámetro y de 2.0 cm de longitud con pudrición de corteza y presencia de cordones miceliales de *P. omnivora*; y 50 muestras de raíces asintomáticas a una profundidad de 20-90 cm. De inmediato, las raíces se colocaron en solución fijadora de FAA (etanol absoluto 50%, ácido acético glacial 5%, formaldehido 10% y agua destilada 35%) como método de preservación. La deshidratación de las raíces se realizó con alcohol etílico a concentraciones gradualmente ascendente (50, 70, 96 y 100%); las muestras permanecieron 4 h en cada alcohol. La infiltración de tejidos se hizo con etanol absoluto + xileno (1:1), tres veces en xileno y dos veces en parafina (3h/inmersión). La inclusión de las muestras en parafina (Paraplast marca SIGMA) consistió en colocar las raíces de manera individual dentro de un molde de papel en forma de cubo ($2cm^3$), se agregó parafina licuada a 60°C y se dejó solidificar durante 24 h a temperatura ambiente. Los cortes histológicos se realizaron con un micrótomo de desplazamiento modelo Spencer 820 (American Optical) de donde se obtuvieron cortes de 10 micrómetros de espesor; estos se colocaron en un baño de flotación con 3.0 g de grenetina a 68°C por 30 segundos y se montaron en portaobjetos, después se realizó la técnica de tinción diferencial safranina O/verde rápido de acuerdo con la metodología de Johansen (1940), finalmente las preparaciones se observaron al microscopio.

5.3. Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales (Experimento 3)

5.3.1. Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se extrajeron de las hojas de té limón (*Cymbopogon citratus*), tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), pitiona (*Lippia alba*), menta (*Mentha piperita*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), cilantro (*Coriandrum sativum*), de las flores de clavo (*Syzygium aromaticum*) y del bulbo de ajo (*Allium sativum*); todas ellas procedentes del municipio de Villa Díaz Ordaz Tlacolula, Oaxaca.

La extracción de los aceites se realizó mediante la técnica de hidrodestilación asistida con microondas. En un matraz tipo bola con capacidad de 2.0 L y montado en un horno de microondas modelo MW840WA (SAMSUNG), se colocó una muestra de 200 g del material vegetal y 1.0 L de agua destilada; el programa de calentamiento fue repartido en periodos de: 3, 1.5, 1.5, 1, 1, 1, 0.5, 0.5 y 8 de 0.25 minutos cada periodo separado por 1.0 min de reposo. La temperatura más alta alcanzada por la muestra fue de 80 °C. Durante la destilación se obtuvo una emulsión de agua y aceite que fue separada por decantación usando una trampa clevenger; el aceite esencial se colocó en un frasco color ámbar y se deshidrató adicionando 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, se mantuvo en agitación por 15 minutos, finalmente se filtró y colocó en un frasco color ámbar y se guardó en refrigeración a 4°C (Figura 7).

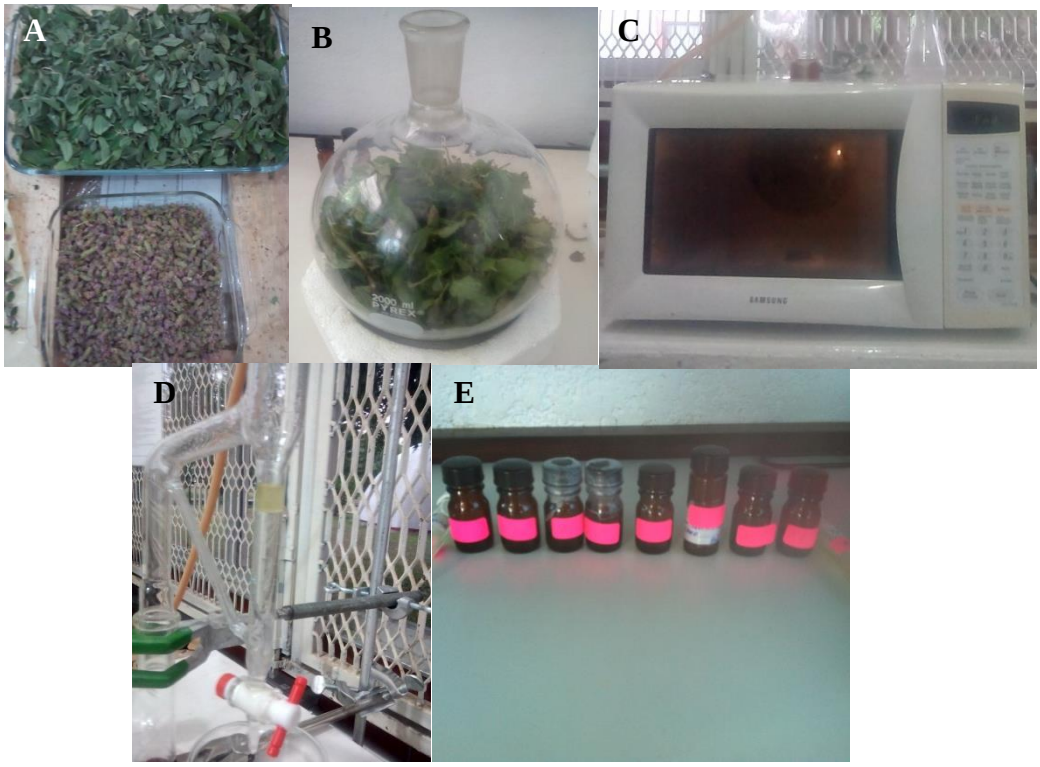

Fig. 7 **Proceso de extracción de aceites esenciales**. A) Material vegetal (hojas, flores y bulbos frescos). B) Matraz bola con 200 g de muestra vegetal. C) Matraz montado en un horno de microondas. D) Trampa clevenger con el aceite esencial E) Aceites esenciales deshidratados.

5.3.2. Actividad antifúngica de los aceites esenciales

Azufre elemental y nueve aceites esenciales a cuatro concentraciones (100, 250, 500 y 1000 $\mu L.L^{-1}$) (Cuadro 3), se mezclaron por separado en matraces con medio de cultivo PDA a 40°C y se vaciaron en cajas de Petri. Un disco micelial de 0.5 cm de diámetro se colocó en el centro de cada caja y se incubaron a 22±2°C, 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Figura 8), el crecimiento micelial (diámetro) fue medido con un vernier cada 24 horas, se consideraron 10 repeticiones por tratamiento, se incluyó un testigo (medio PDA+ disco micelial), se dejó de medir cuando el micelio cubrió la totalidad del medio de cultivo

contenido dentro de una caja Petri de 8.5 cm de diámetro (tratamiento testigo). De los tratamientos donde no se presentó un crecimiento aparente, se retiró el disco micelial y fue transferido a cajas Petri con medio PDA sin aceites esenciales para registrar si el disco micelial fue inhibido o inactivado.

Cuadro 3. Tratamientos establecidos para evaluar el efecto de cuatro concentraciones (100, 250, 500 y 1000 µL.L^{-1}) de nueve aceites esenciales sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. omnivora* en condiciones *in vitro*. Se incluyó un fungicida comercial de contacto y un testigo.

	Concentraciones evaluadas µL.L^{-1}			
Aceite	100	250	500	1000
Origanum vulgare	T1	T2	T3	T4
Coriandrum sativum	T5	T6	T7	T8
Eucalyptus citriodora	T9	T10	T11	T12
Lippia alba	T13	T14	T15	T16
Thymus vulgaris	T17	T18	T19	T20
Syzygium aromaticum	T21	T22	T23	T24
Mentha piperita	--	--	T25	--
Allium sativum	T26	T27	T28	T29
Cymbopogon citratus	T30	T31	T32	T33
Azufre elemental	T34	T35	T36	T37
Testigo	Medio de cultivo PDA sin aceite esencial o azufre			

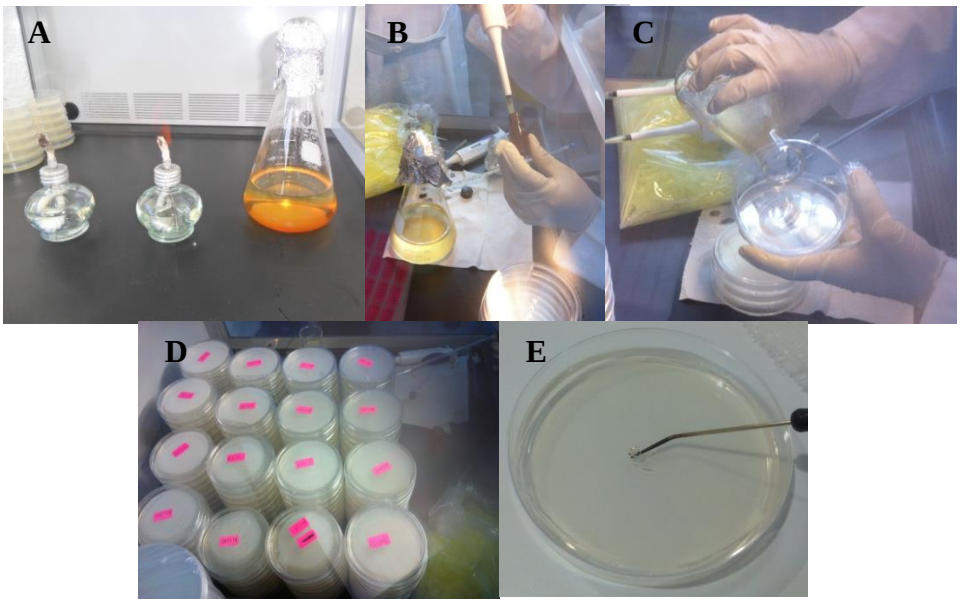

Fig. 8 **Preparación del medio de cultivo PDA + aceites esenciales.** A) Medio de cultivo PDA estéril. B) Adición del aceite esencial al PDA a 40°C. C) Vaciado del medio de cultivo en cajas de Petri. D) Cajas de Petri con PDA + aceites esenciales. E) Colocación del disco micelial de 0. 5 cm de diámetro sobre el medio PDA + aceite esencial.

5.3.3. Análisis estadístico

Se usó un diseño completamente al azar, 37 tratamientos con 10 repeticiones se empleó una caja de Petri como unidad experimental, los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se sometieron a análisis de varianza con mediciones repetidas y comparación de medias de Tukey α=0.05 con el programa estadístico SAS 9.0, el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente formula:

$$\%\ de\ inhibicion = (1 - \frac{Diametro\ del\ tratamieno}{Diametro\ de\ testigo})x\ 100$$

6. RESULTADOS

6.1. Aislamiento de *P. omnivora* (Experimento 1)

En las raíces de los árboles sintomáticos se apreciaron signos fungosos de *P. omnivora* en tres etapas de madurez diferenciados por la consistencia y coloración: cordones miceliales jóvenes de consistencia algodonosa de color blanco; cordones miceliales de color amarillo; y cordones miceliales maduros fuertemente trenzados de color café.

En el 100% de las muestras de cordones blancos sembrados en los medios de cultivo con y sin antibiótico hubo crecimiento micelial; mientras que a partir de los cordones amarillos hubo crecimiento micelial en los medios de cultivo con y sin antibiótico en 55 y 45% respectivamente. Los cordones de color café estuvieron asociados a otros hongos no identificados que crecieron de manera abundante sobre los medios de cultivo evaluados y no hubo crecimiento de *P. omnivora* (Cuadro 4).

El 100% de los esclerocios presentaron germinación de tipo eruptiva a los 5 días después de haberse sembrado en medios de cultivo con y sin antibióticos por lo cual es una estrategia más simple para el aislamiento de este fitopatógeno (Figura 9).

Cuadro 4. Porcentaje de aislamiento de *P. omnivora* obtenido en cada medio de cultivo evaluado.

Medio de cultivo	Muestra sembrada	No. de muestras	Aislamiento de *P.omnivora* (%)
PDA + Sulfato de estreptomicina, Cloranfenicol y Ampicilina a 100 mg/L	Cordón micelial de color blanco	20	100
	Cordón micelial de color amarillo	20	55
	Cordón micelial de color café	20	0
	Esclerocio	15	100
PDA	Cordón micelial de color blanco	20	100
	Cordón micelial de color amarillo	20	45
	Cordón micelial de color café	20	0
	Esclerocio	15	100

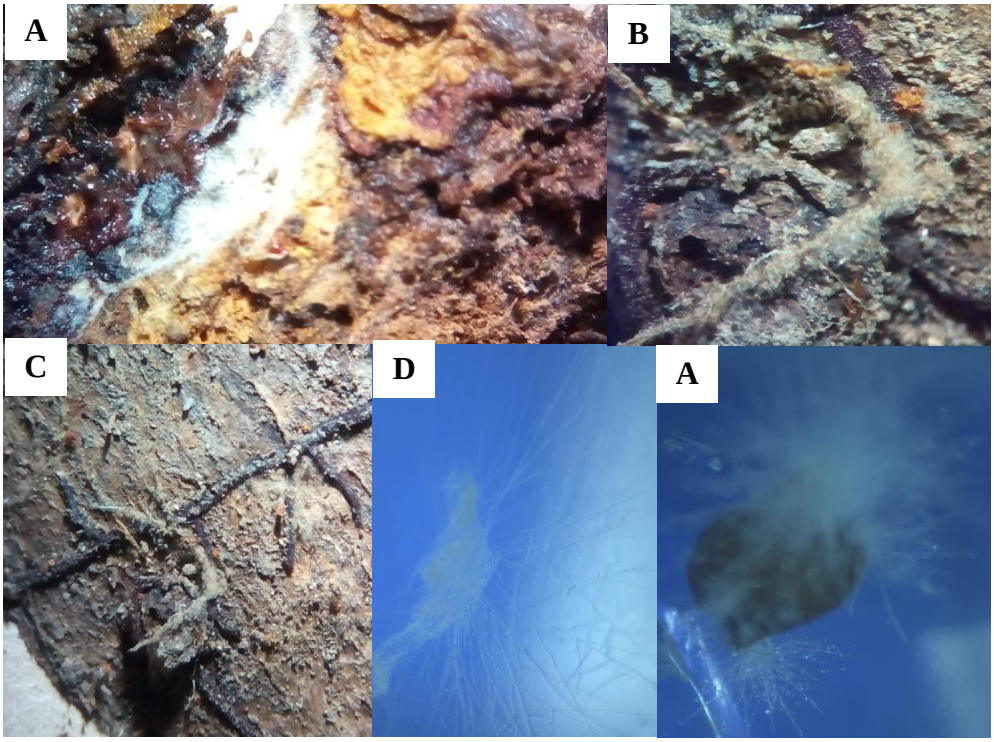

Fig. 9 **Signos fungosos en raíces de mango infectadas.** A) Cordón micelial blanco con crecimiento activo, B) Cordón micelial amarillo, C) Cordón micelial café, D) Segmento de un cordón micelial de color blanco creciendo sobre medio de cultivo PDA sin antibióticos de 5 días de edad E) Esclerocio germinado a los cuatro das después de la siembra..

6.1.1. Identificación del fitopatógeno

6.1.1.1. Caracterización morfológica

El aislado en PDA a 30 días de incubación fue de color blanco con micelio disperso, algodonoso, presencia de las crucetas (estructuras típicas del género) además de otras estructuras formadas por ramificaciones en tres ejes: vertical, transversal y horizontal respetando la formación de ángulos rectos a la cual nos referiremos como tipo estrella (Figura 11). En medio de cultivo PDA a 22±2°C, 12 h luz y 12 h oscuridad la formación de esclerocios inició a los 40 días, a los 50 días se observaron esclerocios con un diámetro entre 2-4 mm. En regiones de la caja de Petri donde el medio de cultivo fue removido a los 60 días se observó la formación de cordones miceliales (múltiples hifas entretejidas alrededor de una hifa central) (Figura10).

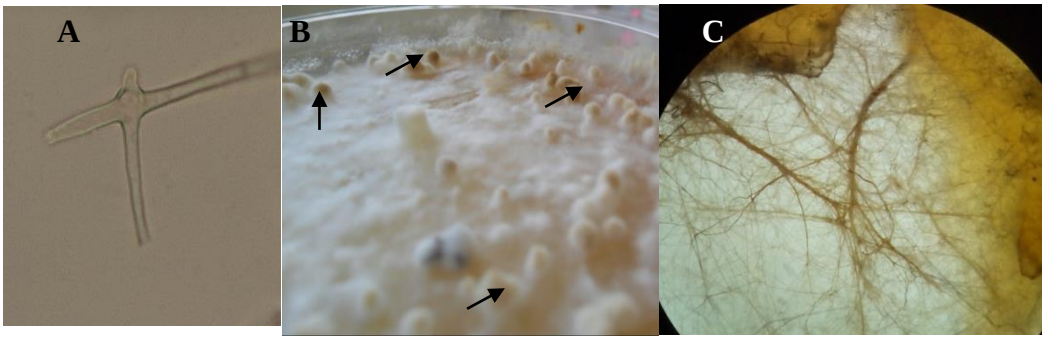

Fig. 10 **Estructuras de *P. omnivora* desarrolladas en medio del cultivo PDA.** A) Célula cruciforme, B) Esclerocios formados a los 50 días, C) Formación de cordones miceliales dentro de una caja de Petri en regiones donde fue removido el medio de cultivo.

6.1.1.2. Caracterización molecular

El análisis molecular confirmó que los cordones miceliales encontrados en la superficie de las raíces de árboles de mango con síntomas de pudrición texana corresponde a

Phymatotrichopsis omnivora. La secuencia de nucleótidos de este hongo fue homologada en un 98% con *P. omnivora* depositado en el banco de genes (NCBI) con numero de acceso EF442000.

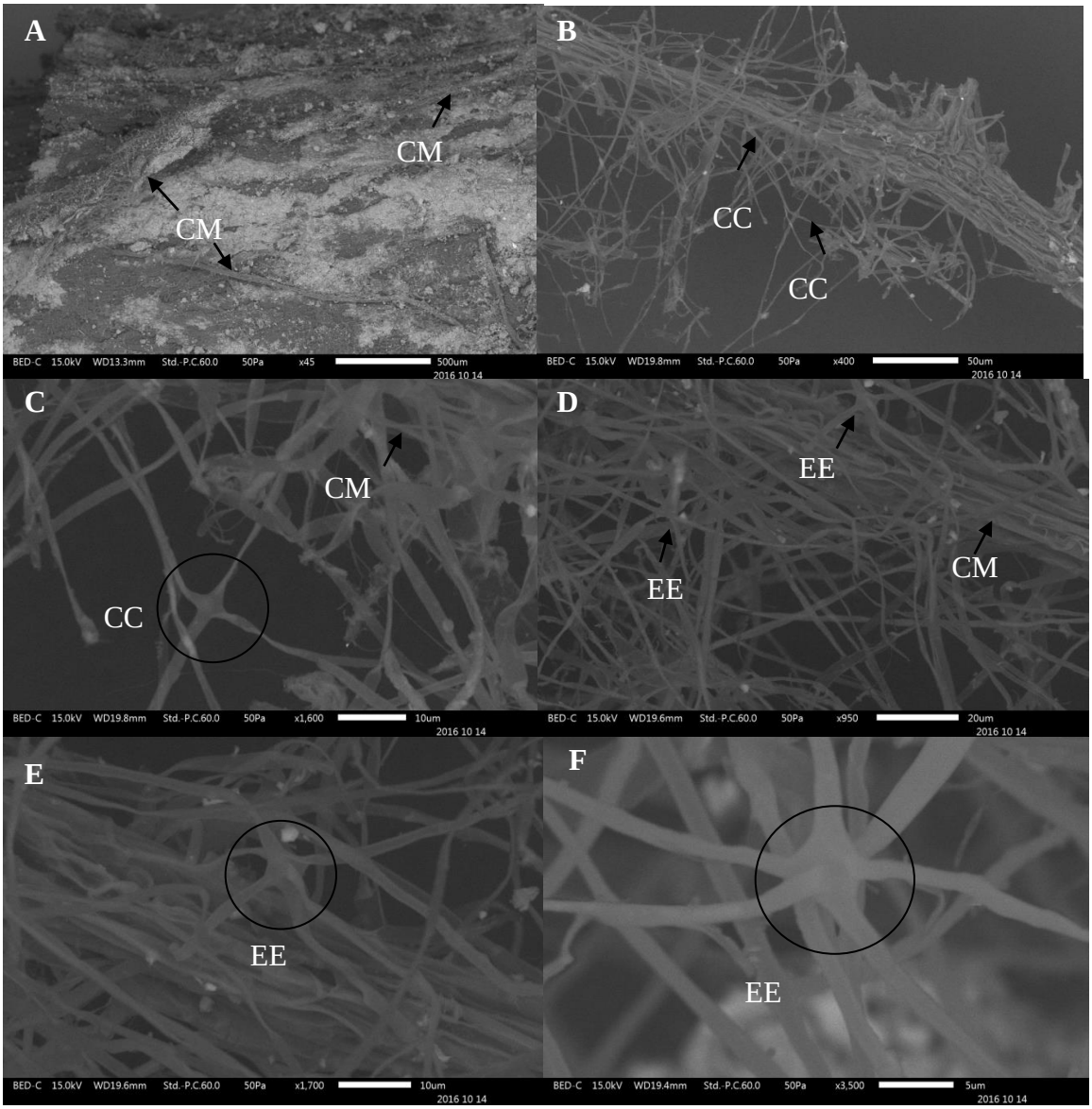

Fig. 11 Estructuras fungosas sobre la superficie de raíces de árboles de mango sintomáticos. A-C) Cordón micelial amarillo con estructuras en forma de cruceta. D-F) Cordón micelial amarillo con estructuras en forma de estrella. CC) Crucetas, EE) Estructuras en forma de estrella, CM) Cordón micelial color amarillo. Microfotografias tomadas con un Microscopio Electrónico de Barrido

6.2. Histopatología (Experimento 2)

En un corte transversal de raíces de mango enfermas observadas en el microscopio Electrónico de Barrido a 200X se apreció el cordón micelial del que se derivaron hifas que penetraron el tejido cortical. La hifa penetró a través de las células de la peridermis para introducirse en los tubos cribosos de floema (Figura 12). Al microscopio óptico se observó daño en la región del floema y células acompañantes las cuales presentaron lisis celular así como la fragmentación y lignificación de las paredes celulares de la endodermis. En las células del xilema no se observó daño ni acumulación de compuestos químicos (Figura 13).

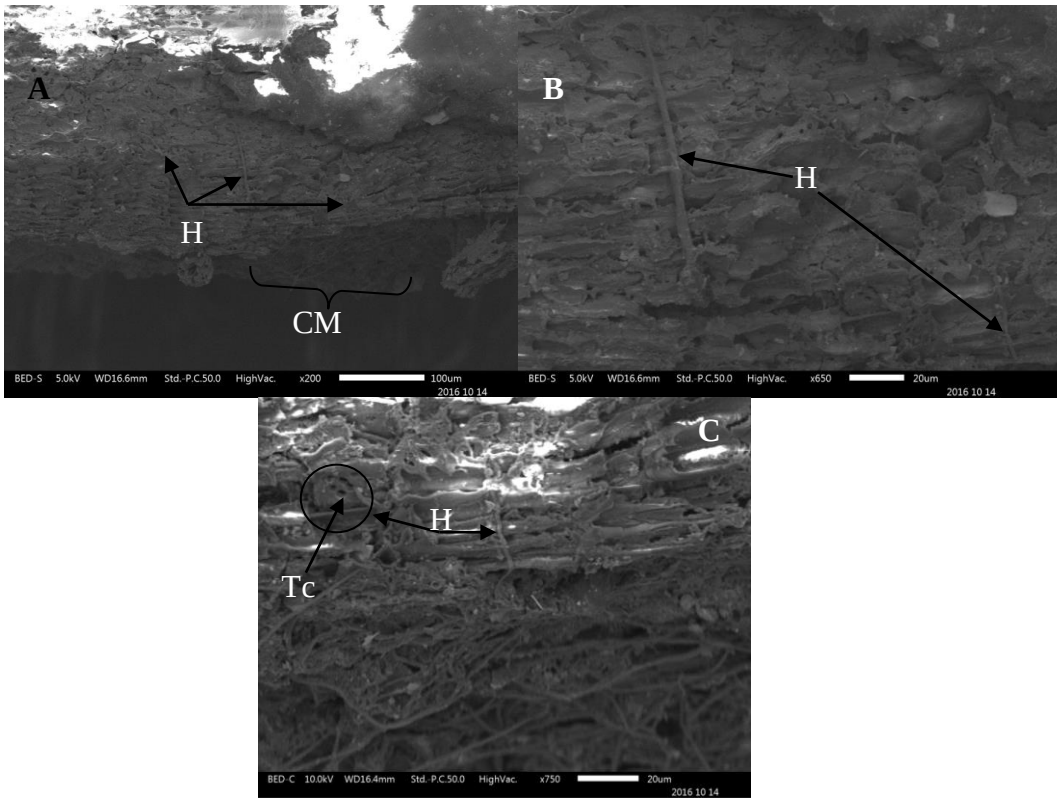

Fig. 12 **Cortes transversales de raíces enfermas observadas con el Microscopio Electrónico de Barrido.** A) Cordón micelial con hifas penetrando tejido cortical. B) Penetración intracelular de una hifa. C) Penetración de la hifa a través de los tubos cribosos. H) Hifa de *P. omnivora*, CM) Cordón micelial, Tc) Tubos cribosos.

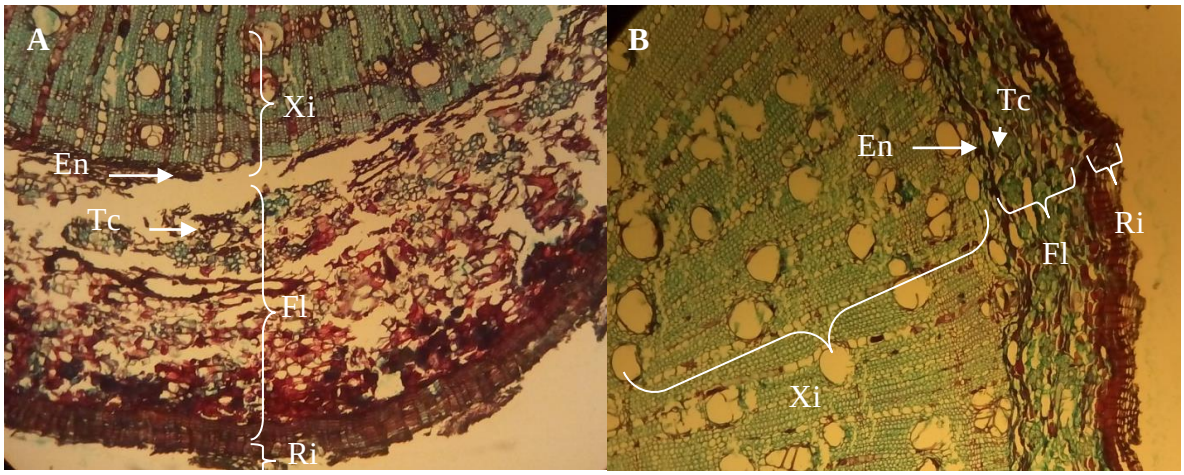

Fig. 13 **Cortes transversales de raíz enferma y sana.** A) Raíz enferma mostrando desprendimiento de corteza, daño en la región de floema, fragmentación y lignificación de las paredes celulares. B) Raíz Sana, Tc) Tubos cribosos, Xi) Xilema, Fl) Floema, Ri) Peridermis En) Endodermis

6.3. Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales (Experimento 3)

El crecimiento micelial de *P. omnivora* en condiciones *in vitro* se inhibió en 100% por efecto de los aceites esenciales de tomillo, te limón y clavo a partir de una dosis de 100 $\mu L.L^{-1}$; cilantro y ajo a la dosis de 250 $\mu L.L^{-1}$; menta a 500 $\mu L.L^{-1}$; y eucalipto y pitiona a 1000 $\mu L.L^{-1}$ (Cuadro 6 y Fig. 14-17).

Los aceites esenciales de ajo a 100 $\mu L.L^{-1}$; eucalipto, pitiona y oregano a 500 $\mu L.L^{-1}$ inhibieron el crecimiento micelial del hongo en un porcentaje mayor a 80% (Cuadro 6 y Fig. 14 y 16). Estos resultados se obtuvieron en un periodo de tiempo de 15 días que fue lo que duró el experimento.

El análisis de varianza de medidas repetidas de los tratamientos que mostraron un porcentaje de inhibición menor a 100% mostró que el cuadrado medio de los tratamientos es mayor que el cuadrado medio del error lo que indica que no existe igualdad en las medias de los tratamientos y calculando el estadístico F podemos concluir que hay una diferencia altamente significativa entre las medias de los tratamientos en todos los días que duró el experimento (Cuadro 5).

Hay diferencia significativa entre todos los tratamientos sin embargo hay tratamientos que entre ellos y según la comparación de medias no presentan diferencia significativa como es el caso del Eucalipto y el Azufre elemental a 100 y 1000 $\mu L.L^{-1}$ respectivamente, cabe destacar que en casos como este se registra una diferencia en cuanto a la dispersión de los datos obtenidos de las unidades experimentales que los componen, en casos como Eucalipto a 100 $\mu L.L^{-1}$ el valor de la desviación estándar ±31.4 fue resultado de unidades experimentales que no presentaron crecimiento en todo el experimento y otras que iniciaron de forma tardía y con bajo porcentaje de inhibición, lo cual nos da porcentajes de inhibición semejantes a los tratamientos donde el crecimiento micelial inicio en todas las unidades experimentales al mismo tiempo sin embargo la tasa de crecimiento fue menor como el caso del Azufre elemental a la máxima concentración y presentando una desviación estándar de ±2.8 (Cuadro 6).

Cuadro 5. Análisis de varianza de medidas repetidas de los tratamientos.

	Día	4***	5***	6***	7***	8***	9***	10***	11***	12***	13***	14***	15***
Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios											
Tratamiento	19	3.9	3.7	3.5	3.2	3.1	3.0	2.9	2.9	2.8	0.8	2.6	2.5
Error	180	0.03	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.01	0.10	0.10
Total	199												

*** Diferencia altamente significativa P<0.0001

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición y desviación estándar del crecimiento micelial de *P. omnivora* tratado con cuatro dosis de nueve aceites esenciales vegetales.

	Concentración $\mu L.L^{-1}$			
Aceite	**100**	**250**	**500**	**1000**
Origanum vulgare	20.2 ± 9.2^{hg}	41.5 ± 16.1^{gef}	83.7 ± 19.8^{cab}	95.4 ± 8.0^{a}
Coriandrum sativum	79.1 ± 33.7^{cab}	100^{+}	100^{+}	100^{+}
Eucalyptus citriodora	69.5 ± 31.4^{dcab}	62.4 ± 28.4^{ced}	94.2 ± 18.3^{a}	100^{+}
Lippia alba	29 ± 21.8^{gf}	49.5 ± 27.6^{edf}	90.5 ± 16.8^{ab}	100^{+}
Thymus vulgaris	100^{+}	100^{+}	100^{+}	100^{+}
Syzygium aromaticum	100^{+}	100^{+}	100^{+}	100^{+}
Mentha piperita	--	--	100^{+}	--
Allium sativum	90.4 ± 16.0^{ab}	100^{+}	100^{+}	100^{+}
Cymbopogon citratus	100^{+}	100^{+}	100^{+}	100^{+}
Azufre elemental	57.6 ± 7.0^{ced}	61.5 ± 5.6^{ced}	66.1 ± 4.5^{cedb}	71.3 ± 2.8^{dcab}

Números seguidos de letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey α=0.05), $^{+}$ Tratamientos que no fueron incluidos en el análisis de comparación de medias

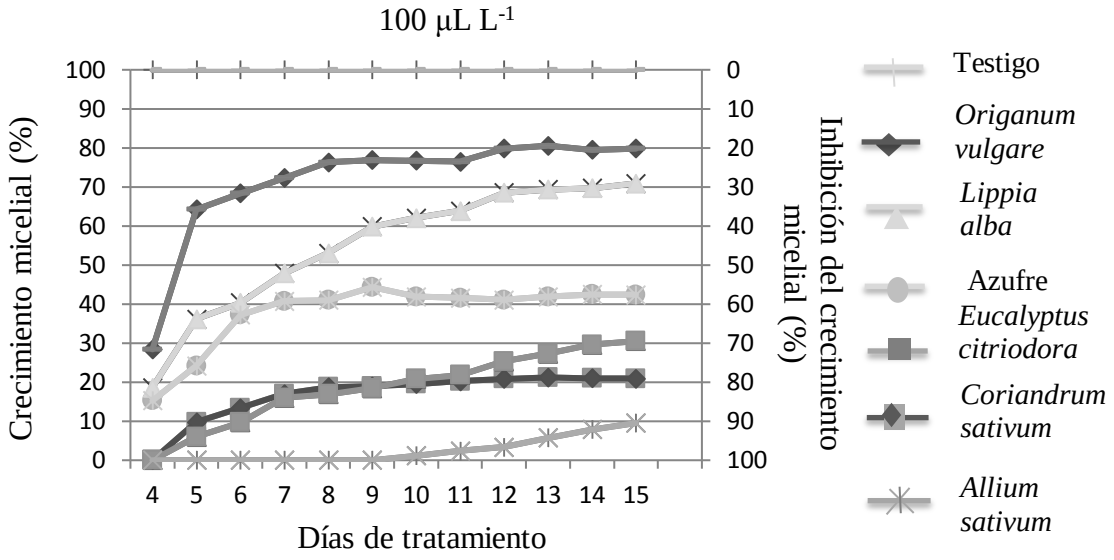

Fig 14. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare, Lippia alba, Eucalyptus citriodora, Coriandrum sativum, Allium sativum* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de .250 µL.L^{-1}en un periodo de 15 días.

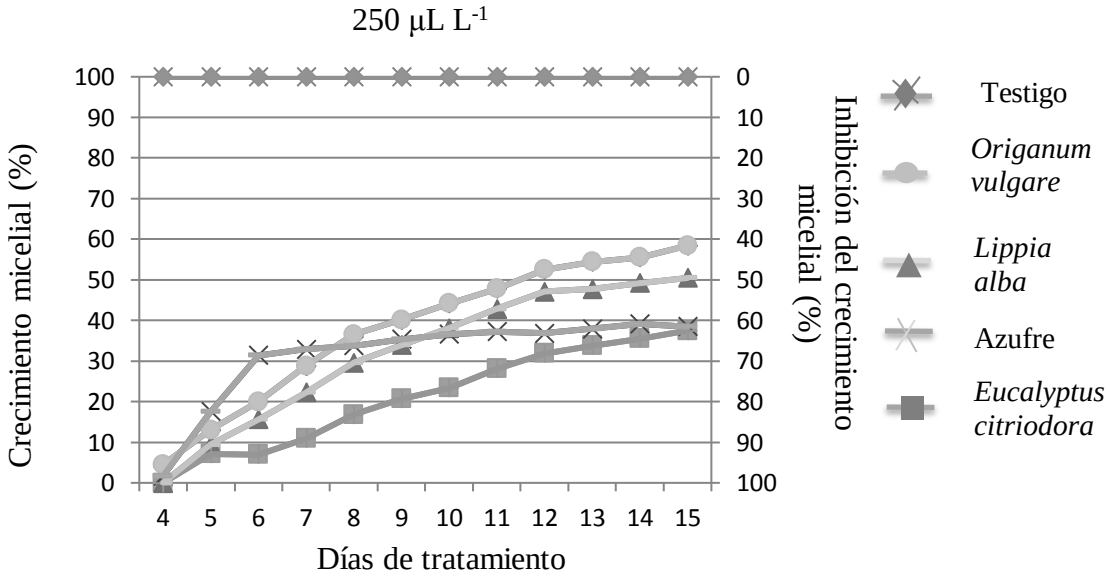

Fig 15. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare, Lippia alba, Eucalyptus citriodora* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de 250 µL.L^{-1}en un periodo de 15 días

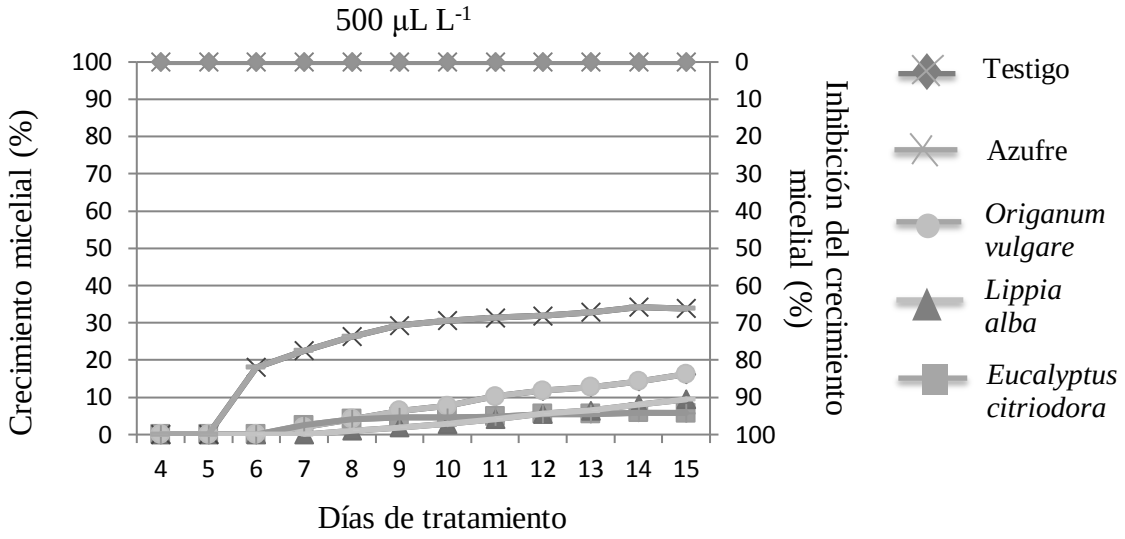

Fig 16. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare*, *Lippia alba*, *Eucalyptus citriodora* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P. omnivora* a una concentración de 500 µL.L^{-1}en un periodo de 15 días

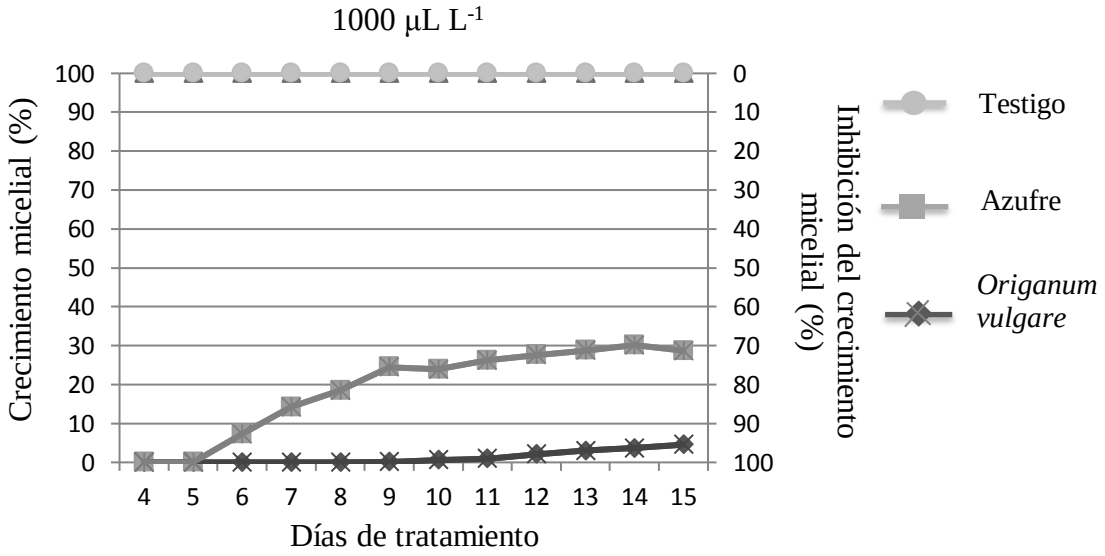

Fig 17. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* y azufre elemental en el crecimiento micelial de *P.omnivora* a una concentración de 1000 µL.L^{-1} en un periodo de 15 días

7. DISCUSIÓN

7.1. Aislamiento de *P. omnivora*

Según Arif *et al.,* (2013) y Cook and Riggs (1993) el aislamiento de *P. omnivora* de suelo o plantas infectadas es difícil y a menudo no se logra, por lo cual se recomienda el uso de antibióticos, así también Upalapati *et al.,* (2009) describe en su metodología la obtención de tejidos superficiales de raíces infectadas de alfalfa sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 0.525% por un minuto y posteriormente sembrarlas en Agua- Agar al 1.8% + Cloranfenicol (100 mg/L) y penicilina G (500 mg/L) sin embargo en este estudio se demostró que para aislar el hongo de raíces de mango, se puede prescindir de los antibióticos, debido a que el éxito de este procedimiento depende de la muestra a sembrar, es necesario contar con micelio activo que generalmente es de color blanco, o bien, colectar esclerocios, desinfestarlos y sembrarlos en PDA. En medio de cultivo PDA sin antibióticos a los 40 días se inicia la formación de esclerocios y a los 50-60 días da por finalizado este proceso, dicho proceso en otros estudios se ha efectuado colocando placas de inóculo en recipientes de vidrio con arena, carbono activado y añadiendo granos de *Sorghum* bicolor L. Moench en un periodo de 60-80 días (Samaniego-Gaxiola, 2008).

La identificación de *P. omnivora* a menudo se logra con las estructuras en forma de cruz, la formación de esclerocios y los cordones miceliales (Uppalapati *et al.,* 2010), Samaniego (2003), con ayuda del Microscopio Electrónico de Barrido fue posible notar la presencia de estructuras en forma de estrella la cual no había sido reportada hasta el momento.

7.2. Histopatología

Según Uppalapati *etal.*, (2009) *P. omnivora* en raíces de *Medicago truncatula* colonizó principalmente las células corticales y por ultimo formó un manto micelial que cubrió la superficie de las raíces a esto se puede añadir que el daño principal se da en el floema y causando el colapso de las células de reserva (parénquima), tubos cribosos y células acompañantes.

7.3. Sensibilidad de *P. omnivora* a aceites esenciales

Los aceites esenciales son una nueva estrategia para el control de hongos fitopatógenos, en diversos estudios en condiciones *in vitro* han demostrado una alta capacidad de inhibir el crecimiento micelia. La efectividad antifúngica del aceite esencial de *Origanum vulgare, Thymus vulgaris* y *Eucalyptus citriodora* se ha evaluado contra *Moniliophthora roreri, Alternaria alternata Aspergillus flavus* respectivamente (Javed, 2012 Lozada *et al.*, 2012 Perina *et al*., 2014). Se documentó que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum, Cymbopogon citratus* y *Thymus vulgaris* a partir de una dosis de 100 $\mu L.L^{-1}$ inhibió en 100% el crecimiento micelial de *P. omnivora*; en contraste, el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* se logró con aceite esencial de *Cymbopogon citratus* a una dosis de 250 $\mu L\ L^{-1}$ (Duarte *et al.*, 2010) y el crecimiento de *Geotrichum citri-aurantii* se inhibió en 94% con *Thymus vulgaris* a 600 $\mu L.L^{-1}$ (Perina *et al*., 2014)

Los resultados de esta investigación pueden ser mejorados cuidando aspectos como la adición de un agente emulsificante que permita la distribución homogénea del aceite esencial en el medio de cultivo ya que esto genera conflictos como es el caso de los

tratamientos con *Lippia alba*, *Eucalyptus citriodora* y *Coriandrum sativum* a 100 $\mu L.L^{-1}$ donde la desviación estándar muestra valores elevados.

De cualquier forma, queda demostrada la capacidad de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris* para inhibir el crecimiento micelial de *P. omnivora*, dando pie al desarrollo de nuevos estudios que permitan conocer que molécula(s) presente(s) en los aceites esenciales es/son la(s) responsable(s) de la actividad antifúngica.

8. CONCLUSIONES

Phymatotrichopsis omnivora se aisló de raíces de árboles de mango de 4 años de edad a partir de cordones miceliales de color blanco (cordones jóvenes) en medio de cultivo agar-dextrosa-papa con y sin antibióticos (Sulfato de estreptomicina, Cloranfenicol y Ampicilina a 100 mg/L). Se presentó crecimiento después de 5 días

El hongo no se pudo aislar a partir de cordones miceliales de color amarillo (cordones maduros).

El crecimiento micelial de *P. omnivora*, en condiciones *in vitro*, se inhibió en 100% por el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus, Thymus vulgaris, y Syzygium aromaticum* a partir de una concentración de 100 $\mu L\ L^{-1}$, *Coriandrum sativum y Allium sativum* lo hicieron a partir de 250 $\mu L.L^{-1}$, *Mentha piperita* a partir de 500 $\mu L.L^{-1}$ finalmente *Eucalyptus citriodora y Lippia alba* a 1000 $\mu L.L^{-1}$. El aceite esencial de *Origanum vulgare* y el azufre elemental inhibieron el 95 y 71% del crecimiento micelial respectivamente a 1000 $\mu L.L^{-1}$. Los catorce tratamientos restantes presentaron un porcentaje de inhibición menor al 100%.

Las raíces de árboles de mango infectadas por *P. omnivora* sufrieron invasión y lisis de las células de la peridermis, floema y células acompañantes. En el tejido de la endodermis se observó lisis, fragmentación y lignificación de las paredes celulares.

9. LITERATURA CITADA

- Abawi G. S. and Pastor-Corrales M. A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 114p.
- Adebayo O., Dang T., Bélanger A. and Khanizadeh S. 2013. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial Formulation against *Botrytis cinerea*. Journal of Food Research. 2 (1):217-226
- Arias Y., González I., Pino O., Sánchez Y., Miranda I., Martínez Y., y Peteira B. 2011. Caracterización bioquímica de seis genotipos promisorios de tomate obtenidos en programas de mejoramiento genético para la resistencia al TYLCV. Protección Vegetal. 26: 40-44.
- Arif M., Fletcher J., Marek S. M., Melcher U., Ochoa-Corona F. M. 2013. Development of a rapid, sensitive and field-deployable razor ex-biodetection system and quantitative PCR Assay for detection of *Phymatotrichopsis omnivora* using multiple gene targets. Applied and Environmental Microbiology. 79 (7):2312-2320
- Bally, I., 2006. *Mangifera indica* (mango). Special Profiles for Pacific Island Agroforestry. www.traditionaltree.org
- Barnett H. L. and Hunter B. B. 1987. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Fourth edition.
- Cervantes-Martínez, R., Hernández-Hernández V., González-Cervantes G., Favela-Chávez E. y Álvarez-Reyna V. P. 2010. Antagonismo de cepas nativas de *Trichoderma* sp. aisladas en la Comarca Lagunera contra *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar. Revista Agraria-Nueva Época. 7: 34-40.
- Cook C. G. and Riggs J. L. 1993. Isolation and Identification of *Phymatotrichum omnivorum* from Kenaf in the Lower Rio Grande Valley of Texas.Plant Dis. 77:1263.
- Duarte A. N., Luís S. F., Teixeira D. M. C., Mara F. G., Delarmelina C., Aparecida B. E., Sartoratto A. 2010. Control of *Colletotrichum gloeosporioides (penz.) Sacc.* In yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil.

- Herrera P. T., y Samaniego G. J. A. 2002. Enfermedades del nogal. Tecnología de producción en nogal pecanero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental La laguna. pp.177-195
- Hu P., Wang A. S., Egledow E. S., Hollister E. B., Rothlisberger K. L., and Matocha J. E. 2011. Inhibition of germination and growth of *Phymatotrichopsis omnivora* (cotton root rot) by oilseed meals and isothiocyanates. Aplied Soil Ecology. 49: 68-75.
- Javed S., Shoaib A., Mahmood Z., Mushtaq S. and Iftikhar S. 2012. Analysis of phytochemical constituents of Eucalyptus citriodora L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 26:18, 1732-1736.
- Johansen D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw Hill, New York, USA. 503 p.
- Kenerley C., Ivors K., Appel D. and Nelson S. 1994. Spatial and temporal dynamics of epidemics in apple orchards caused by *Phymatotrichopsis omnivora*. Phytopathology 84:1142.
- Khaledi N., Taheri P. and Tarighi S. 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, P.O.Box: 91775-1163, Mashhad, Iran.
- Khoury M., Stien D., Ouaini N., Eparvier V., Arnold A N., El Beyrouthy M. 2014. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. Growing Wild in Lebanon. Chemistry & Biodiversity. 11: 1990 – 1997.
- Lozada B. S., Herrera L. V., Perea J. A., Stashenko E. E. y Escobar P. 2012. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta agronómica. 61 (2):102-110.
- Lyda S. D. 1978. Ecology of *Phymatotrichum omnivorum*. Ann. Rev. Phytopathol. 16:193-209.
- Montiel J. M., Mesa A. C. A., Durán C., Bueno J. B., Betancur G. L. y Stashenko E. E. 2007. Evaluación de la actividad anti-*Candida* y anti-*Aspergillus* de aceites

esenciales de *Lippia alba* (miller) n.e Brown quimiotipo carvonalimoneno y su asociación con sus componentes mayoritarios. Scientia Et Technica. 13 (33): 243-246.

- Noriega C. D. H., Cruzale S. R., Leyva M. A., Lorenzada A. F. 2012. Guía para la producción de Mango en Guerrero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo experimental Iguala, Guerrero, México. 56 p.
- Perina F. J., Amaral C. D., Fernandes S. R., Labory R. G. C., Teixeira A. G. y Alves E. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. Society of Chemical Industry.
- Ringuelet J., y Viña S. 2013. Productos Naturales Vegetales. Ed. La Plata. Universidad Nacional de la Plata. 258 p.,
- Rodríguez A. M., Alcaraz M. L. y Manuel R. C. S. 2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Ed. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur, México. 38 p.
- Samaniego G. J. A. Herrera P. T., Pedroza S. A., Jiménez D. F., y Ll. Chew M. Y. 2003. Fluctuación de la severidad de Pudrición Texana *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert en Nogal Pecanero (*Carya illinoenesis* K.) bajo las condiciones de la Comarca Lagunera, México. Revista Mexicana de Fitopatología.21: 143-151.
- Samaniego-Gaxiola J. A. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. Revista Mexicana de Fitopatología. 26 (1): 32-39.
- Sepúlveda G. J. Porta D. H., y Rocha S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 355-363.
- Stashenko E. E. 2009. Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander. Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales. 180 p.

- Todd-Watson W., Nye-Appel D., Aloysius-Arnold M., Miller-Kenerley C., Lester-Starr J. y Martínez-Trinidad T. 2007. Inoculación, síntomas, y colonización en árboles de manzano en contenedor por *Phymatotrichopsis omnivora* (duggar) Hennebert. Agrociencia. 41: 459-468.
- Uppalapati S. R., Young C. A., Marek S. M. and Mysore K. S. (2010), Phymatotrichum (cotton) root rot caused by *Phymatotrichopsis omnivora*: retrospects and prospects. Molecular Plant Pathology, 11: 325–334.
- Uppalapati S. R., Marek S. M., Lee H.-K., Nakashima J., Tang Y., Sledge M. K., Dixon R. A. and Mysore K. S. 2009. Global gene expression profiling during *Medicago truncatula-Phymatotrichopsis omnivora* interaction reveals a role for jasmonic acid, ethylene, and the flavonoid pathway in disease development. Molecular Plant-Microbe Interactions. 22 (1):7-17.
- Vargas-Arispuro, I. y Contreras V. A. 2006. Arilselenofosfatos con acción antifúngica selectiva contra *Phymatotrichopsis omnivora.* Fitotecnia Mexicana. 29: 171-174.
- Whitham S., Dinesh-Kumar S. P., Choi D., Hehl R., Corr C. and Baker B. 1994 The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. Cell. 78:1101-1115.
- FAOSTAT 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/
- The American Phytopathological Society 2016 http://ww{w.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Mango.aspx