

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

Saccharicola sp., AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL TULE (*Typha domingensis* Pers).

MANUEL SILVA VALENZUELA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

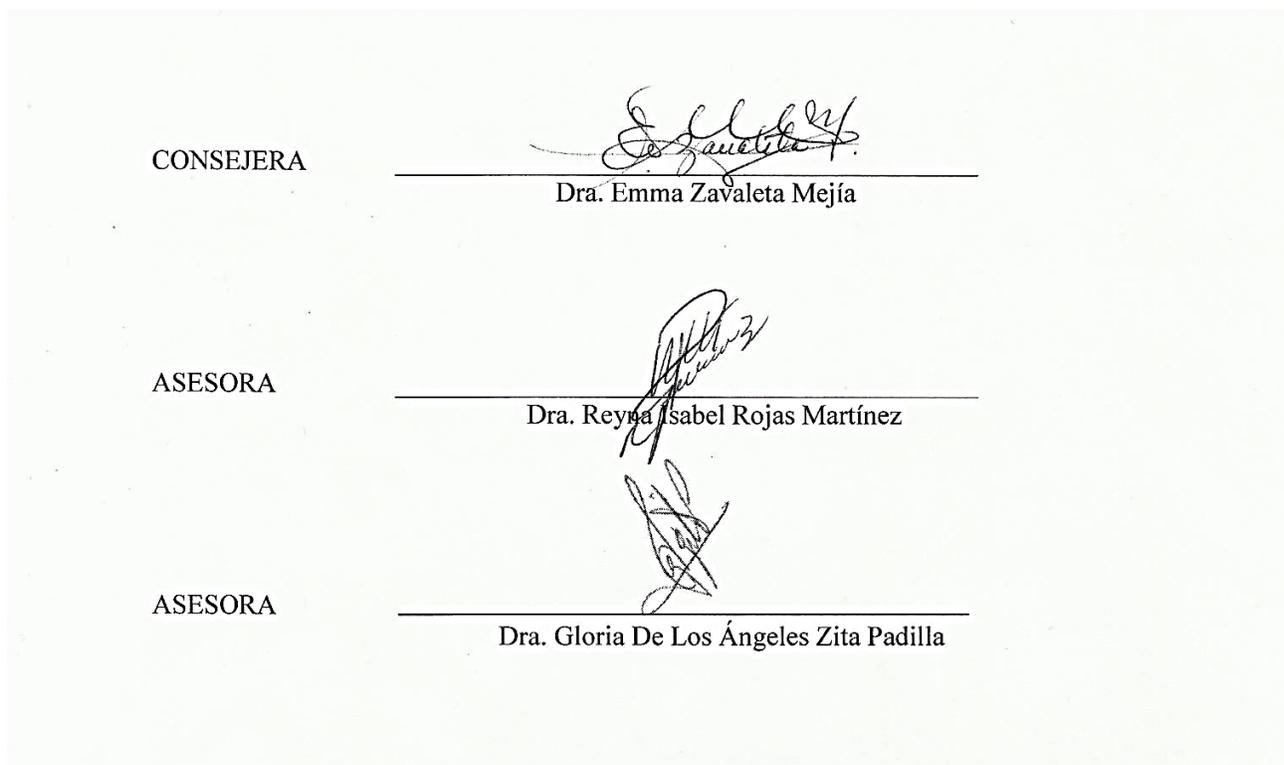
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: *Saccharicola* sp., AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL TULE (*Typha domingensis* Pers.) realizada por el alumno: Manuel Silva Valenzuela bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR



Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero 2015

RESUMEN

Saccharicola sp., AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL TULE (*Typha domingensis* Pers)

Manuel Silva Valenzuela, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

El tule (*Typha domingensis* Pers.) ocupa el tercer lugar dentro de las malezas acuáticas de mayor importancia económica en México. Su manejo mediante el control químico y mecánico ha sido poco efectivo. El control biológico constituye una alternativa para mitigar los efectos del tule, por lo anterior, se probó la patogenicidad de ocho cepas de hongos (*Mucor* sp., *Peyronellaea glomerata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium* sp., cepas 2.5 y 2.6 de *Alternaria alternata* y la cepa TS1), aisladas de hojas de tule con lesiones necróticas. Mediante pruebas “*in vitro*”, utilizando hojas desprendidas de tule, se determinó que los hongos: *Mucor* sp., *P. glomerata*, *Cladosporium* sp., *A. alternata* 2.5 y TS1 fueron patogénicos, siendo este último el más virulento y agresivo. Con la inoculación de la cepa TS1 en plantas de tule adultas se reprodujeron los síntomas observados en campo y se reaisló al hongo. Para determinar su potencial patogénico en especies de plantas cultivadas, se realizaron “pruebas de rango de hospedantes” con 46 cultivares de importancia agrícola; solamente las plantas de chícharo, cilantro, col de bruselas, espinaca, melón y sandía mostraron susceptibilidad al hongo TS1 y los 40 cultivares restantes no fueron infectados. Por sus características morfológicas, el análisis molecular (amplificación con los iniciadores ITS1F e ITS4R) y el estudio filogenético, se determinó que el hongo corresponde al género *Saccharicola*. Los resultados obtenidos indican que *Saccharicola* sp. es patógeno del tule, y por consiguiente un agente de control biológico con potencial para esta maleza.

Palabras clave: Tule, *Saccharicola* sp., Control biológico.

ABSTRACT

Saccharicola Sp., BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF CATTAIL (*Typha domingensis* Pers.)

Manuel Silva Valenzuela, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

Cattail (*Typha domingensis* Pers.) ranks third in aquatic weeds of major economic importance in Mexico. Its management through chemical and mechanical control has been ineffective. Biological control is an alternative to mitigate the effects of cattail. Therefore, the pathogenicity of eight strains of fungi, isolated from cattail leaves with necrotic lesions (*Mucor* sp., *Peyronellaea glomerata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium* sp., strains 2.5 and 2.6 of *Alternaria alternata* and the TS1 strain) was tested. Through "in vitro" tests, using detached cattail leaves, we determined that the isolates: *Mucor* sp, *P. glomerata*, *Cladosporium* sp, *A. alternata* 2.5 and TS1 were pathogenic, being the last one the most virulent and aggressive. With the inoculation of the TS1 strain in adult cattail plants, the symptoms observed in the field were reproduced and the fungus was re-isolated. To determine its pathogenic potential in cultivated plant species, "host range tests" were performed with 46 cultivars of agricultural importance; from those only pea, coriander, brussels sprouts, spinach, melon, and watermelon plants showed susceptibility to the TS1 fungus and the remaining 40 cultivars were not infected. From their morphological features, molecular analysis (amplification with ITS1F and ITS4R primers) and the phylogenetic study, we determined that the fungus corresponds to the *Saccharicola* genus. The results obtained indicate that *Saccharicola* sp. is a pathogen of cattail and a potential agent for biological control of this weed.

Keywords: Cattail, *Saccharicola* sp., Biological control.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y al Instituto de Fitosanidad por la oportunidad otorgada para realizar mis estudios de maestría; así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y al pueblo de México por el financiamiento otorgado durante mis estudios.

A mi consejera, Dra. Emma Zavaleta Mejía, por compartir conmigo su experiencia, por su paciencia durante la elaboración de la presente tesis, por sus consejos y por iniciar mi formación como fitopatólogo.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez, por su paciencia, asesoría y apoyo en la elaboración del presente trabajo, y por contribuir a mi formación como profesionista.

A la Dra. Gloria de los Ángeles Zita Padilla, por su apoyo, comprensión y asesoría en la realización de la presente investigación, y por motivarme a seguir preparándome.

Al Maestro Macos Espadas Reséndiz, por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo y por el préstamo de material de laboratorio.

A la Ph. D. Bonnie L. Maidak, por su asesoría y apoyo para subir secuencias a la base de datos del GenBank.

A la M. C. Olivia Nabor Romero, por su apoyo y asesoría en la identificación del organismo en estudio.

Al fideicomiso revocable de administración e inversión No. 167304 por el financiamiento otorgado.

DEDICATORIA

A Dios, por ayudarme a finalizar esta meta; y permitirme aprender cosas nuevas todos los días.

A mis padres, Margarita Valenzuela Vásquez y Manuel Silva Rosas por su apoyo incondicional, el cual me ha permitido cumplir varias metas, entre ellas la obtención del grado. Muchas gracias por todo su amor y dedicación con mis hermanos, y conmigo; son unos excelentes padres y un ejemplo a seguir.

A mis hermanos Cristina, Maria del Pilar, Moisés y Araceli, por su apoyo y compañía, son unos excelentes hermanos. A mi sobrina Elena, por siempre recibirme con un abrazo y por hacernos muy felices a todos en casa.

A mis abuelos; Antonia, Melchor, Vicente y Adelfa; por compartir conmigo su tiempo y recibirme de la mejor manera allá en Oaxaca.

A mi amada Oly, quien con su compañía, comprensión, apoyo y amor, ha llenado de felicidad mi vida, permitiéndome ser una mejor persona, gracias por estar a mi lado.

A todos mis maestros del Posgrado, Dra. Reyna, Dra. Gloria, Maestro Marcos y en especial a la Dra. Emma.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
Generalidades del tule (<i>Typha domingensis</i> Pers.)	6
Taxonomía.....	7
Distribución de <i>Typha domingensis</i>	7
Importancia económica	8
Estrategias de manejo del tule	9
Control Mecánico	9
Control Químico.....	10
Control Cultural	10
Control Biológico	11
Control biológico clásico de malezas	13
Control biológico aumentativo de malezas	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Pruebas de patogenicidad “ <i>in vitro</i> ”	26
Pruebas de patogenicidad en planta adulta de <i>Typha domingensis</i>	27
Pruebas de rango de hospedante.....	27
Análisis estadístico.....	28
Identificación morfológica y molecular de TS1.	29
Análisis de secuencias de DNA.	30
IV. RESULTADOS.....	31
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES	46
VII. LITERATURA CITADA	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamientos reportados como patógenos y como asociados al tule.	11
Cuadro 2. Organismos usados como agentes de control biológico de malezas.....	13
Cuadro 3. Organismos empleados en el control biológico clásico	15
Cuadro 4. Aislamientos de organismos reportados para control biológico aumentativo.....	18
Cuadro 5. Micoherbicidas comerciales.	25
Cuadro 6. Virulencia y desarrollo de síntomas y signos de aislamientos fungosos inoculados en hojas desprendidas de tule (<i>Typha domingensis</i> Pers.).....	31
Cuadro 7. Desarrollo de síntomas, tiempo en que aparecieron (dpi, días posteriores a la inoculación) y signos en plantas adultas de tule (<i>Typha domingensis</i> Pers.) inoculadas con dos niveles de propágulos del aislamiento TS1.	33
Cuadro 8. Especies de plantas inoculadas con dos niveles de propágulos (10^4 y 10^6 ufc) de TS1 en la prueba rango de hospedantes.....	35
Cuadro 9. Porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas de DNA extraído de micelio desarrollado a partir de diferentes aislamientos de la cepa TS1, con las reportadas en el GenBank.	39
Cuadro 10. Secuencias usadas en el análisis filogenético de la región ITS1-5.8s-ITS2 de la cepa TS1.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Typha domingensis</i> en México. Tomado del Sistema de Información de Especies invasoras (SNIB-CONABIO).....	8
Figura 2. Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> de hongos asociados al tule. A) Bioensayo establecido para inocular hojas desprendidas. B) Incubación en cuarto de crecimiento.....	26
Figura 3. Prueba de rango de hospedantes del aislamiento TS1.....	28
Figura 4. Síntomas inducidos por: <i>Mucor</i> sp. (A1), <i>P. expansum</i> (A2), <i>P. glomerata</i> (A3), <i>Cladosporium</i> sp. (A4), <i>A. alternata</i> 2.5 (A5) y TS1 (A6) en hojas desprendidas de tule.....	32
Figura 5. Síntomas inducidos por el aislamiento TS1. A) Testigo; B) Progreso del desarrollo de síntomas en hoja desprendida de tule; C) Crecimiento micelial sobre lesión necrótica y diferenciación de células pseudoparenquimatosas. pi= posteriores a la inoculación.....	32
Figura 6. Patogenicidad de TS1 en planta adulta. A) Hoja no inoculada (izquierda) y hoja inoculada (derecha); B) Plantas no inoculadas (izquierda) y plantas inoculadas (derecha); brotes producidos por los rizomas de las plantas enfermas.	34
Figura 7. Respuesta de cultivares a la inoculación con TS1. A) Altamente susceptible (planta de espinaca), completamente colonizada por el hongo; B) Moderadamente susceptible (hojas de col de bruselas con lesiones necróticas); C) Ligeramente susceptible (planta de melón, dos a tres hojas con lesiones incipientes); D) Inmune (planta de chile jalapeño, sin síntomas).	36
Figura 8. Formación de cuerpos fructíferos inmersos en el tejido foliar del tule esterilizado tras la inoculación de TS1. A) Representación esquemática del picnidio desarrollado en tejido foliar; B) Tipo de conidios: 1. Conidio inmaduro con cuatro septos gatulados, 2. Conidio en proceso de maduración, 3. Conidio maduro; C) Células conidiógenas.	37
Figura 9. Desarrollo del picnidio. A) Diferenciación de células pseudoparenquimatosas (10x). B) Picnidio maduro (10x). C) Desarrollo del picnidio en la hoja de tule. D) Ostiolo papilado del picnidio (40x). E) Abundante producción de conidias en arreglo uniseriado. F) Conidios con cuatro septos gatulados.....	38
Figura 10. Fragmentos amplificados a partir de DNA del aislamiento TS1. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb axygen®; 2-6) PCR con iniciadores ITS1F e ITS4R, respectivamente; 8) PCR con iniciadores específicos EF-728F y EF-986R de la cepa TS1.	39
Figura 11. Análisis filogenético de la región ITS1-5.8s-ITS2 rDNA, que muestra la relación de las secuencias obtenidas ^z de aislamientos de TS1 con secuencias de los géneros <i>Saccharicola</i> , <i>Paraphaeosphaeria</i> , <i>Phaeosphaeria</i> , <i>Leptosphaeria</i> y <i>Stagonospora</i> reportadas en el GenBank utilizando el método Neighbour-Joining con un re-muestreo de 5000 réplicas	41

I. INTRODUCCIÓN

El tule (*Typha domingensis* Pers.) es una maleza acuática anual del tipo emergente, con gran capacidad de invadir infraestructura hidráulica, principalmente canales y drenes de vasos reguladores (Bonilla y Santamaría, 2013). Está considerada dentro de las 10 malezas acuáticas con mayor impacto económico a nivel mundial; las cuales generan en USA un gasto anual de 100 millones de dólares para su control (Charudattan, 2005, 2001a; Barreto *et al.*, 2000). Esta maleza acuática se propaga por semilla (sexual) y por rizomas (asexual), es nativa de América y está ampliamente distribuida en Eurasia, Medio Oriente y África. La planta adulta posee un total de siete hojas, una altura promedio de 2.44 m y una densidad aproximada de 69 plantas/m² (Camarena y Aguilar, 2012; Smith 2000, 1987).

Cuando esta maleza acuática incrementa su población, provoca una diversidad de efectos negativos, como son: disminución de la disponibilidad de agua para riego, al obstruir su paso por los canales que la conducen; causa inundaciones al impedir el paso del agua por drenes de vasos reguladores y la acumulación de sedimentos en presas; en asociación con el lirio acuático (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) disminuye los niveles de oxígeno afectado a la fauna acuática presente; sustituye a la flora local; alberga insectos vectores de enfermedades humanas (malaria y dengue); e interfiere en la pesca y actividades acuáticas recreativas que en algunas zonas representan el principal ingreso de muchas familias (Charudattan, 2001b; Barreto *et al.*, 2000; Martínez y Charudattan, 1998; Espadas y Zita, 1992). El control cultural, químico y mecánico ha sido poco exitoso para disminuir altas infestaciones de esta maleza (Martínez, 2014; Camarena y Aguilar, 2012; Charudattan, 2005; Corns y Grupta, 1971).

Una alternativa para disminuir los efectos del tute, la constituye el control biológico. El uso de enemigos naturales que muestran un alto grado de especificidad sobre una maleza objetivo, resulta por lo general en su control. Las estrategias de manejo biológico que se pueden usar son: Control Biológico Clásico y Control Biológico Aumentativo; el primero se aplica a malezas exóticas usando organismos antagónicos específicos procedentes de la región de origen de la maleza a controlar y en el segundo se emplean organismos antagónicos nativos con un alto grado de especificidad con la maleza a controlar; los organismos antagónicos utilizados en estas estrategias se denominan agentes de control biológico (acb). Hongos, bacterias, virus y nematodos son los acb que con mayor frecuencia se han utilizado en el Control Biológico Aumentativo (Charudattan, 2005, 2001a, 2001b, 2001c, 1996; Charudattan y Dinooor, 2000; Julien y Griffiths, 1998; Julien y White, 1997).

El uso de hongos en el Control Biológico Aumentativo de malezas terrestres, ha conducido a la comercialización de micoherbicidas principalmente en Canadá, USA, Australia y Nueva Zelandia. En el mercado están disponibles los productos: Smolder®, formulado con *Alternaria destruens* y utilizado contra cúscuta parasítica (*Cuscuta gronovii*) en arándanos agrios (Hopen *et al.*, 1997; Bewick, *et al.*, 1987); Chontrol® o MycoTech® o BioChon® formulados a base de *Chondrostereum purpureum* y aplicados sobre tocones de árboles de hoja ancha (Becker *et al.*, 2005; de Jong, 2000); BioMal® que contiene conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* y es utilizado para el control de la malva (*Malva pusilla*); Collego® (*Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*) aplicado contra *Aeschynomene virginica* en campos de arroz; Stumpout® formulado con *Cylindrobasidium laeve* utilizado para matar tocones de *Acacia mearnsii* y *Acacia pycnatha*; DeVine® (*Phytophthora palmivora*) controla *Morrenia odorata*; Dr. BioSedge® formulado con *Puccinia canaliculata* para el control de juncia avellanada (*Cyperus esculentus*); y

Dyer's woad rust strain Woad 006489® que emplea a *Puccinia thlaspeos* para el control de la hierba pastel (*Isatis tinctoria*) (Charudattan, 2005; Charudattan y Dinoor 2000).

Otros agentes de control biológico de naturaleza fungosa son: *Ascochyta caulina*, usado contra el epazote cenizo (*Chenopodium album*), *Colletotrichum truncatum* para Hemp sesbania (*Sesbania exaltata*), *Phomopsis amaranthicola* y *Dactylaria higginsii* para el control de diferentes especies de amaranto (*Amaranthus* sp.) y juncia (*Cyperus rotundus*), respectivamente (Kadir y Charudattan, 2000; Charudattan y Dinoor, 2000).

Para malezas acuáticas, en Brasil se está desarrollando un micoherbicida a base de *Fusarium graminearum* para controlar a la elodea (*Egeria* sp.) (Charudattan y Dinoor 2000; Barreto *et al.*, 2000). Otros aislamientos con potencial para desarrollar micoherbicidas contra malezas acuáticas son: *Fusarium culmorum* contra hidrila (*Hydrilla verticillata*), el cual al combinarse con el insecto *Hydrellia pakistanae* aumenta el control de la maleza (Shabana *et al.*, 2003), *Alternaria alternata* para controlar lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) (Mohan *et al.*, 2002, 2003; Martínez y Charudattan, 1998), *Cercospora piaropi* y *Acremonium zonatum* tienen potencial para establecer programas de control biológico de lirio acuático. *Bipolaris* sp., *Alternaria eichhorniae*, *Myrothecium roridum*, *Rhizoctonia solani* y *Uredo eichhorniae* son considerados como candidatos potenciales para controlar lirio acuático (Charudattan, 2001b; Charudattan, 2001c; Martínez y Gutiérrez, 2001; Martínez y Charudattan, 1998).

Otros aislamientos que están siendo evaluados como potenciales acb de malezas acuáticas son: *Nimbya alternantherae*, altamente patógeno en la maleza caimán (*Alternanthera philoxeroides*) (Pomella *et al.*, 2007; Spencer y Coulson, 1976); *Septoria lythrina* y *Cercospora pistiae* patógenos

de salicaria púrpura (*Lythrum salicaria*) (Nyvall y Hu, 1997) y de la lechuguilla de agua (*Pistia stratiotes*) (Barreto *et al.*, 2000), respectivamente; y *Drechslera* sp. con características deseables para mitigar altas infestaciones del helecho de agua (*Salvinia molesta*) (Barreto *et al.*, 2000).

Para el caso particular del tule (*Typha domingensis*), los hongos con potencial de acb incluyen a: *Epipolaeum typharum*, *Colletotrichum typhae* y *Phoma typhae-domingensis*, los cuales están siendo evaluados en Brasil para la elaboración y comercialización de microherbicidas contra esta maleza (Barreto *et al.*, 2000). En México se reporta a *Colletotrichum* sp. como su antagonista natural (Espadas y Zita 1992); en la India, Ponnappa (1968) consigna a *Alternaria tenuissima*, *Cochilobolous lunatus*, *Cryptomela typhae*, *Didymosphaeria futilis*, *Drechslera hawaiiense*, *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaeria michotti*, *L. typhae*, *L. typharum*, *Mycosphaerella tassiana*, *M. typhina*, *Periconia byssoides*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Phoma* sp., *P. typharum* y *Pithomyces chartarum* como patógenos de esta maleza; de igual forma Pugh y Mulder (1971) reportan a *Alternaria tenuis*, *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces* sp., *Cephalosporium* sp., *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum* y *Phoma typharum*. Cabe mencionar que las cepas determinadas como *L. typhae* y *L. michotti* han sido reclasificadas como *Phaeosphaeria typhae* y *Paraphaeosphaeria michotti*, respectivamente (Câmara *et al.*, 2001, 2002; Shoemaker y Babcock, 1988).

Adicionalmente se reportan 26 cepas de hongos asociadas a síntomas necróticos en hojas de tule (Kowalik y Krasny, 2009; Mazurkiewicz-Zapałowicz *et al.*, 2006). Estos antagonistas podrán considerarse acb una vez que se confirme su especificidad patogénica en esta maleza.

En relación con el hongo *Saccharicola*, a la fecha no se ha consignado su patogenicidad en especies de maleza; el género fue propuesto en 2003, a partir de un aislamiento que estaba clasificado como *Leptosphaeria bicolor* y reportado como fitopatógeno en el cultivo de la caña de azúcar en Kenia (Kaiser *et al.*, 1979). Por ahora se conocen solamente dos especies *S. bicolor* y *S. taiwanensis*, ambas patógenas de la caña de azúcar. En Brasil se aisló una cepa endófito de *Saccharicola* sp. de este cultivo y en ella se detectaron genes asociados a la producción de metabolitos secundarios denominados “poliquétidos”. Tales compuestos presentan estructuras químicas muy variadas y su síntesis se asocia con la presencia de proteínas denominadas PKS (poliquétidos sintasas). Los poliquétidos poseen actividad antibacteriana (eritromicina y tetraciclinas), inmunosupresora (rapamicina), antitumoral (daunorrubicina y doxorubicina), anticolesterémica (estatinas) y antiparasítica (ivermectina) (Kwan y Schulz, 2011). Dichos compuestos son producidos por plantas, hongos y bacterias (Kwan y Schulz, 2011) y además de su amplia aplicación en medicina humana y animal, también tienen potencial para su aplicación en la agricultura e industria química (Rojas *et al.*, 2012).

Por la importancia económica que tiene esta maleza en México y debido a que se han realizado pocas investigaciones tendientes a determinar qué hongos de los que se encuentran asociados a ella, podrían seleccionarse como candidatos para controlarla, el presente trabajo tuvo por objetivos: 1) realizar las pruebas de patogenicidad de ocho aislamientos de hongos asociados a lesiones necróticas en hojas de tula, para seleccionar el más virulento, y 2) de éste determinar su rango de hospedantes en hortalizas de importancia agrícola.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del tule (*Typha domingensis* Pers.)

El tule es una planta acuática perenne del tipo emergente, originaria de América, de distribución nativa, herbácea y que se propaga por semilla y rizomas. Llega a medir hasta 5 m de alto y por lo general las hojas sobrepasan la altura de las espigas. La parte superior de las vainas esta atenuada hacia la lámina foliar, generalmente son asimétricas y ocasionalmente simétricas, la epidermis de la superficie contiene una gran cantidad de glándulas mucilaginosas de color oscuro, dispuestas en líneas longitudinales y comúnmente extendiéndose hacia la base de la lámina foliar, el envés es ligeramente convexo cerca de la vaina y plano hacia el ápice. Los órganos sexuales se desarrollan en las espigas, las que contienen a las inflorescencias femeninas y son de mayor longitud y las masculinas de menor tamaño; las inflorescencias son de color pardo claro con una o más brácteas foliáceas caducas. Las flores masculinas tienen de 2 a 4 estambres total o parcialmente soldados y las flores femeninas tienen ovario fusiforme, estilo de 1 a 2 mm de largo, estigma largo y delgado, de 0.5 a 1.5 mm de largo y el fruto es fusiforme (Bonilla y Santamaría, 2013; Smith, 2000, 1987, 1967).

Se reconocen de ocho a 13 especies, en ocasiones estas pueden confundirse con nuevas especies, por ello Smith (1987) sugiere que en regiones tropicales, se debe caracterizar como *Typha domingensis* a las siguientes sinonimias: *T. agustata*, *T. australis*, *T. brownii*, *T. javanica* y *T. grossheimii*. En Norteamérica es común que se confunda a *T. domingensis* con *T. angustifolia* (Smith y Newman, 2001; Smith, 2000, 1987, 1967).

Taxonomía

La clasificación más actual de esta planta acuática se muestra a continuación (Smith y Newman, 2001; Smith, 2000).

Reino:	Plantae
Subreino:	Viridiplantae
Superdivisión:	Embryophyta
División:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Typhaceae
Género:	Typha
Especie:	<i>T. domingensis</i>

Distribución de *Typha domingensis*

Es una planta cosmopolita que se encuentra ampliamente distribuida en regiones con climas tropicales, subtropicales y mediterráneos, asimismo es común encontrarla en América, Eurasia, Medio Oriente y África (Camarena y Aguilar, 2012; Smith 2000, 1987).

Con base a datos de colectas geo-referenciados y disponibles en el Sistema de Información de Especies Invasoras (SNIB-CONABIO) se determinó que el tule está presente en la mayoría de los estados de México a excepción de Durango y Zacatecas (Figura 1).

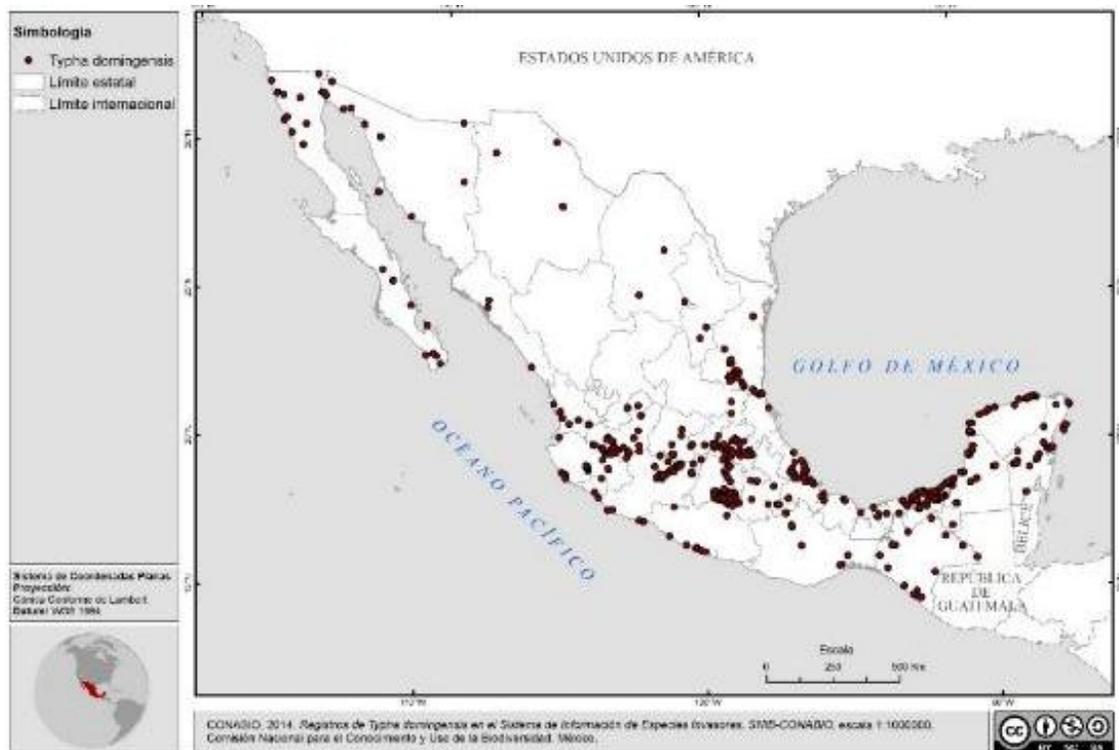


Figura 1. Distribución de *Typha domingensis* en México. Tomado del Sistema de Información de Especies invasoras (SNIB-CONABIO).

Importancia económica

Esta planta es empleada en jardines acuáticos, en arreglos florales, en la elaboración artesanal de diferentes productos (sillas, sombreros y hamacas, entre otros) y en la construcción de techos de chosas, y petriles (Bonilla y Santamaría, 2013).

Debido a que está ampliamente distribuida en el país; es común que invada cuerpos de agua artificiales por lo que se le considera una maleza acuática traslocada de importancia económica por su habilidad para infestar diques, presas, drenes de vasos reguladores y canales de riego; dicha habilidad es atribuida a su capacidad para retener sedimentos, que ocupa como sustrato para su propagación vegetativa (Camarena y Aguilar, 2012; Smith 2000, 1987; Gutiérrez *et al.*, 1994). En

mayor o menor grado se encuentra infestando los canales de los principales distritos de riego en el país como son: el DR 010 Culiacán-Humaya, Sinaloa; DR 014 Río Colorado, Baja California; DR 018 Colonias Yaquis, Sonora; DR 024 Ciénega de Chapala, Michoacán; DR 025 Bajo Río San Juan Tamaulipas; DR 030 Valsequillo, Puebla y el DR 092 Pánuco, Veracruz (Camarena y Aguilar, 2012).

El tule es reconocida como una maleza acuática de gran persistencia que produce enormes cantidades de semilla, pues se estima que por inflorescencia produce hasta 5 millones de semillas; por lo tanto el banco de semillas disponible es muy alto (Bojórquez, 1999). Los problemas que ocasiona son: 1) sustitución de la flora nativa; 2) aceleración de los procesos de eutroficación; 3) disminución de la velocidad de conducción de agua al obstruir el canal; 4) inundaciones al taponear los drenes de vasos reguladores; 5) al asociarse con otras malezas acuáticas disminuye la concentración de oxígeno matando a la fauna local y creando un ambiente anaerobio ideal para el desarrollo de algas; 6) alberga insectos vectores de enfermedades humanas (dengue, malaria y fiebre amarilla); 7) puede ser reservorio de fitopatógenos (hongos y virus); y 8) impedir actividades deportivas acuáticas, que en algunas regiones son una fuente de ingreso para la población local (Charudattan, 2001a; Barreto *et al.*, 2000; Bojórquez, 1999, 2009).

Estrategias de manejo del tule

Control Mecánico

Esta estrategia emplea maquinaria denominada pesada y ligera; es realizada principalmente en drenes y canales de riego y su objetivo es extraer la mayor cantidad de plantas presentes en el canal, pero su costo es elevado. Respecto a la maquinaria denominada pesada, daña a los canales

revestidos incrementando aún más los costos de aplicación. El equipo denominado ligero, está diseñado específicamente para uso en infraestructura hidráulica (barra taludadora y desbrozadora), reduce los gastos de operación y el daño a canales revestidos, pero en ambos casos su eficiencia contra el tule es baja, debido a sus características biológicas ya mencionadas (Camarena y Aguilar, 2012, Bojórquez, 1999, 2009).

Control Químico

La comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. (CICOPLAFEST) mantiene regulado el uso de pesticidas en cuerpos de agua, permitiendo solo tres productos: Glufosinato de amonio, Diquat y Glifosato, para el caso del tule se aplica Diquat antes de la floración y Glifosato durante la floración a una dosis de 5-10 l/ha en 100 litros de agua, la aplicación de estos químicos no garantiza el control del tule debido a la gran capacidad que tiene de generar nuevos brotes (Espadas y Zita, 1992). Otra desventaja del control químico es el uso irracional de estos productos, lo que provocaría la aparición de biotipos resistentes a ellos (Heap, 2006). A nivel mundial también se aplica dalapón, 2, 4-D y amitrol que han mostrado efectividad contra el tule (Corns y Gupta, 1971).

Control Cultural

Esta estrategia se aplica cuando el grado de infestación es bajo y radica en la extracción manual de plantas y de rizomas. El método es efectivo pero muy costoso porque emplea mucha mano de obra, lo que algunos casos lo hace incosteable (Camarena y Aguilar, 2012).

Control Biológico

Para esta maleza acuática aún no se tiene registro de algún agente de control biológico (acb), pero sí tanto de organismos fungosos con potencial para generar programas de control (Kowalik y Krasny, 2009; Mazurkiewicz-Zapałowicz *et al.*, 2006; Barreto *et. al.*, 2000; Espadas y Zita, 1992; Ponnappa, 1968), como de aislamientos asociados a esta maleza. Por consiguiente existe una gran cantidad de cepas que pueden ser estudiadas y evaluadas para seleccionar potenciales acb para el control de esta maleza (Cuadro 1).

Para otras malezas acuáticas de importancia económica en México, el control biológico ha sido un componente importante en las estrategias de manejo integrado (Martínez, 2014; Camarena y Aguilar, 2012; Martínez y Gutiérrez, 2001; Martínez y Charudattan, 1998).

Cuadro 1. Aislamientos reportados como patógenos y como asociados al tule.

Patógeno aislado	País	Estatus	Referencia
15 cepas colectadas y aisladas de diferentes síntomas	India	Aislamiento e identificación de cepas patógenas	Ponnappa, 1968.
<i>Alternaria tenuis</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Cephalosporium</i> sp. <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Phoma typharum</i> <i>Sporobolomyces</i> sp.	Inglaterra	Aislamiento e identificación de cepas patógenas	Pugh y Mulder, 1971.
<i>Colletotrichum</i> sp.	México	Candidato a acb	Espadas y Zita 1992.
<i>Colletotrichum typhae</i> <i>Epipolaeum typharum</i> <i>Phoma typhae-domingensis</i>	Brasil y República Dominicana	Candidatos para micoherbicidas	Barreto <i>et al.</i> , 2000

<i>Acremonium alternatum</i> <i>Alternaria Alternata</i> <i>Colletotrichum typhae</i> <i>Dasyscyphus contraversus</i> <i>Fusarium coeruleum</i> <i>Monodictys levis</i> <i>Psathyrella typhae</i> <i>Staganospore sacchari</i> <i>Ulocladium Botrytis</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i> <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> <i>Cladosporium</i> <i>macrocarpum</i> <i>Chaetomium elatum</i> <i>Epicoccum purpurascens</i> <i>Humicola fuscoatra v.</i> <i>fuscoatra</i> <i>Leptosphaeria typhae</i> <i>Leptosphaeria typharum</i> <i>Mammaria</i> <i>echinobotryoides</i> <i>Mortierella isabellina</i> <i>Mortierella alpina</i> <i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> <i>Phialophora richardsiae</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium steckii</i> <i>Phoma hedericola</i> <i>Periconia typhicola</i> <i>Scopulariopsis koningii</i> <i>Sordaria fimicola</i> <i>Trichothecium roseum</i> <i>Ulocladium botrytis</i>	Polonia	Aislamiento e identificación de cepas asociadas a tule	Mazurkiewicz-Zapałowicz <i>et al.</i> , 2006.
<i>Mammaria</i> <i>echinobotryoides</i> <i>Mortierella isabellina</i> <i>Mortierella alpina</i> <i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i> <i>Phialophora richardsiae</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium steckii</i> <i>Phoma hedericola</i> <i>Periconia typhicola</i> <i>Scopulariopsis koningii</i> <i>Sordaria fimicola</i> <i>Trichothecium roseum</i> <i>Ulocladium botrytis</i>	Polonia	Aislamiento e identificación de cepas asociadas a tule	Kowalik y Krasny, 2009.

Para el caso particular de malezas, el control biológico se define como la acción directa y/o indirecta de depredadores, patógenos y/o parásitos; está basado en su liberación y/o aplicación premeditada y tiene por finalidad reducir la densidad de población de la maleza objetivo (Charudattan, 2005; Julien y White, 1997). El control biológico de malezas se hace mediante Control Biológico Clásico o Control Biológico Aumentativo, los organismos empleados en ambas estrategias pueden ser de diferente origen (Cuadro 2). Estos tienen en común, un marcado

antagonismo y especificidad contra malezas objetivo, características que se determinan mediante pruebas de inanición en el caso de insectos y peces, y pruebas de rango de hospedantes en bacterias, nematodos, hongos y virus. (Charudattan, 2005, 2001a, 2001b, 2001c, 1996; Charudattan y Dinoor, 2000 Julien y Griffiths, 1998; Julien y White, 1997; Cock, 1996).

Cuadro 2. Organismos usados como agentes de control biológico de malezas.

Naturaleza del antagonista	Agente de control biológico	Maleza objetivo	País	Referencia
Nematodo	<i>Subanguina picridis</i>	<i>Rhaponticum repens</i>	Canadá	Watson, 1986a, 1986b Ou y Watson, 1993
Virus	<i>Tobacco mild green mosaic tobamovirus</i> (TMGMV)	<i>Solanum iarium</i>	EUA	Ferrell <i>et al.</i> , 2008.
Bacteria	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tagetis</i>	<i>Cirsium arvense</i>	Europa	Müller y Nentwig, 2011.
Hongo	<i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta</i> sp.	EUA	Charudattan, 2005.
Pez	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Hydrilla verticillata</i>	México	Camarena y Aguilar, 2012.

Control biológico clásico de malezas

Se aplica sobre malezas exóticas, mediante el uso de acb procedentes de la región de origen de la maleza a controlar y que teóricamente no formen parte del ecosistema, dada su alta especificidad con la maleza. Los principales acb usados en esta estrategia son insectos y hongos y su especificidad con la maleza se determina mediante pruebas de inanición, de selectividad y de rango de hospedante con un amplio rango de plantas cultivables y no cultivables similares a la maleza a controlar (Julien y Griffiths, 1998; Julien y White, 1997).

La aplicación en campo de esta estrategia de control tiene un costo elevado, en general es empleado por productores con vastos recursos económicos, el grado de control observado es alto y redituable; los países que encabezan los casos de éxito son: EUA, Canadá, Australia y Nueva Zelandia; esto

se debe, en gran medida a que cuentan con leyes y protocolos que describen las metodologías para la obtención de un acb (Charudattan, 2005, 2001a). En un esfuerzo por difundir y hacer accesible estas metodologías en países en vías de desarrollo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en colaboración con el Instituto Internacional de Control Biológico (IIBC) creó en 1992 guías para el desarrollo de programas de control biológico clásico (Cock, 1996) las cuales están disponible en la página web:

<http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s00.htm#Contents>

Entre los casos más exitosos se reporta el control de nopal (*Opuntia vulgaris*) con larvas de *Dactylopusis ceylonicus* y *Cactoblastis cactorum* en Australia, el combate de *Salvinia molesta* con *Cyrtobagous salviniae* en África, el control de *Chromolaena odorata* con *Pareochaetes pseudoinsulata* en África (Julien y White, 1997). En México se ha controlado exitosamente al lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) utilizando los curculionidos *Neochetina bruchi* y *N. eichhorniae* (Julien y Griffiths, 1998; Aguiar *et al.*, 2003). En la literatura también se reportan casos exitosos utilizando aislamientos de origen fungoso (Cuadro 3) (Winston *et al.*, 2014; Julien y Griffiths, 1998; Julien y White, 1997).

Cuadro 3. Organismos empleados en el control biológico clásico

Agente de control biológico (insecto)	Maleza objetivo		País
	Nombre científico	Nombre común	
<i>Longitarsus quadriguttatus</i> <i>Mogulones crucifer</i> <i>Agapeta zoegana</i> <i>Bangasternus fausti</i> <i>Chaetorellia acrolophi</i> <i>Cyphocleonus achate</i> <i>Larinus minutus</i> <i>Larinus obtusus</i>	<i>Cynoglossum officinale</i>	Cinoglosa	EUA
<i>Metzneria paucipunctella</i> <i>Pelochrista medullana</i> <i>Pterolonche inspersa</i> <i>Sphenoptera jugoslavica</i> <i>Terellia virens</i> <i>Urophora affinis</i> <i>Urophora quadrifasciata</i> <i>Aulacidea acroptilonica</i> <i>Jaapiella ivannikovi</i> <i>Galerucella calmariensi</i> <i>Galerucella pusilla</i>	<i>Centaurea diffusa</i>	White Knapweed	EUA
<i>Hylobius transversovittatus</i> <i>Nanophyes marmoratus</i> <i>Cheilosia grossa</i> <i>Hadroplontus litura</i> <i>Rhinocyllus conicus</i>	<i>Rhaponticum repens</i>	Russian knapweed	EUA
<i>Trichosirocalus horridus</i> <i>Urophora cardui</i> <i>Urophora stylata</i> <i>Bruchidius villosus</i> <i>Exapion fuscirostre</i> <i>Leucoptera spartifoliella</i> <i>Exapion ulicis</i> <i>Tetranychus lintearius</i> ^w <i>Aulacidea subterminalis</i> <i>Microlarinus lareynii</i> <i>Microlarinus lypriformis</i> <i>Botanophila seneciella</i> <i>Cochylis atricapitana</i>	<i>Lythrum salicaria</i>	Salicaria	EUA
<i>Longitarsus jacobaeae</i> <i>Tyria jacobaeae</i> <i>Aceria chondrillae</i> <i>Bradyrrhoa gilveolella</i> <i>Cystiphora schmidtii</i> <i>Bangasternus orientalis</i> <i>Chaetorellia australis</i> <i>Chaetorellia succinea</i> <i>Eustenopus villosus</i> <i>Larinus curtus</i>	<i>Carduus nutans</i>	musk thistle	EUA
	<i>Cytisus scoparius</i>	Retama negra	EUA
	<i>Ulex europaeus</i>	Retamo espinoso	EUA
	<i>Pilosella flagellaris</i>	Orange hawkweed	EUA
	<i>Tribulus terrestris</i>	Puncturevine	EUA
	<i>Jacobaea vulgaris</i>	Hierba de Santiago	EUA
	<i>Chondrilla juncea</i>	achicoria	EUA
	<i>Centaurea solstitialis</i>	abrepuño	EUA

<i>Urophora sirunaseva</i>			
<i>Agrilus hyperici</i>			
<i>Aphis chloris</i>			
<i>Aplocera plagiata</i>			
<i>Chrysolina hyperici</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	hipérico	EUA
<i>Chrysolina quadrigemina</i>			
<i>Zeuxidiplosis giardi</i>			
<i>Brachypterolus pulicarius</i>			
<i>Calophasia lúnula</i>			
<i>Mecinus janthiniformis</i>	<i>Linaria vulgaris</i>	linaria	EUA
<i>Rhinusa antirrhini</i>			
<i>Rhinusa linariae</i>			
<i>Aphthona cyparissiae</i>			
<i>Aphthona czwalinai</i>			
<i>Aphthona flava</i>			
<i>Aphthona lacertosa</i>			
<i>Aphthona nigriscutis</i>	<i>Euphorbia esula</i>	Leafy spurge	EUA
<i>Hyles euphorbiae</i>			
<i>Lobesia euphorbiana</i>			
<i>Oberea erythrocephala</i>			
<i>Spurgia capitigena</i>			
<i>S. esulae</i>			
<i>Aceria malherbae</i> ^x	<i>Convolvulus arvensis</i>	correhuela	EUA
<i>Tyta luctuosa</i>			
<i>Microplontus edentulus</i>			
<i>Omphalapion hookerorum</i>	<i>Tripleurospermum inodorum</i>	manzanilla	EUA
<i>Rhopalomyia tripleurospermi</i>			
Agente de control biológico (hongo)	Maleza objetivo	Nombre científico	Nombre común
<i>Maravalia cryptostegiae</i>		<i>Cryptostegia grandiflora</i>	Rubber vine
<i>Puccinia chondrillina</i>		<i>Chondrilla juncea</i>	achicoria dulce
<i>Puccinia evadens</i>		<i>Baccharis halimifolia</i>	chilca
<i>Sphaerulina mimosae-pignae</i>		<i>Mimosa pigna</i>	carpinchera
<i>Uromyces galegae</i>		<i>Heliotropium europaeum</i>	verrucaria
<i>Phragmidium violaceum</i>		<i>Rubus procerus</i>	
<i>Uromyces galegae</i>		<i>Galega officinalis</i>	galega
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>		<i>Clidemia hirta</i>	soapbush
<i>Puccinia carduorum</i>		<i>Cardus tenuiflorus</i>	<i>Cardus tenuiflorus</i>
<i>Entyloma compositarum</i>		<i>Ageratina riparia</i>	sándara
<i>Uromycladium tepperanium</i>		<i>Acacia saligna.</i>	acacia de hoja azul
<i>Puccinia chondrillina</i>		<i>Chondrilla juncea</i>	achicoria
<i>Puccinia jacea var. solstitiali</i>		<i>Centaurea solstitialis</i>	abrepuno
Organismos con potencial para acb clásico	Maleza objetivo	Nombre científico	Nombre común
<i>Puccinia acroptili</i> ^z		<i>Rhaponticum repens</i>	Russian knapweed
<i>Coniatus splendidulus</i> ^y		<i>Tamarix chinensis</i>	
<i>Diorhabda spp.</i> ^y		<i>Tamarix ramosissima</i>	Tamarix

<i>Altica carduorum</i> ^y			
<i>Lema cyanella</i> ^y			
<i>Psylliodes chalconera</i> ^y			
<i>Urophora solstitialis</i>			
<i>Aceria anthocoptes</i> ^x	<i>Carduus nutans</i>	musk thistle	EUA
<i>Cassida rubiginosa</i> ^y			
<i>Cleonis pigra</i> ^y			
<i>Larinus carlinae</i> ^y			
<i>Puccinia carduorum</i> ^z			
<i>Terellia ruficauda</i> ^y			
<i>Aceria genistae</i> ^x			
<i>Agonopterix nervosa</i> ^y	<i>Cytisus scoparius</i>	Retama negra	EUA
<i>Arytainilla spartiophila</i> ^y			
<i>Agonopterix nervosa</i>	<i>Ulex europaeus</i>	Retamo espinoso	EUA

Tomado de Winston *et al.*, 2014; Julien y Griffiths, 1998 y Julien y White, 1997. ^zHongo, ^yInsecto, ^xAcaro, ^wAraña roja

Control biológico aumentativo de malezas

Esta estrategia se aplica contra malezas exóticas o endémicas, con acb originarios del lugar donde la maleza está causando el problema, éstos deben expresar una alta patogenicidad y especificidad contra la maleza objetivo, a pesar de que estos organismos forman parte del ecosistema, en ocasiones no controlan de manera natural a la maleza; sin embargo, cuando son producidos masivamente y aplicados sobre ellas impactan de manera negativa a la población de la maleza. Los principales acb empleados en esta estrategia son hongos, los cuales son de fácil manipulación, asimismo se reportan nematodos, bacterias y en menor proporción virus. En el Cuadro 4 se presenta un inventario de organismos empleados en esta estrategia (Charudattan, 2005 y 2001b).

Cuadro 4. Aislamientos de organismos reportados para control biológico aumentativo.

Aislamientos exitosos como acb aumentativo y en vías de desarrollo de Micoherbicidas				
Maleza	Aislamiento	Cultivo	País	Referencia
<i>Acacia saligna</i>	<i>Uromycladium tepperianum</i>	Varios cultivos	Sudáfrica	Morris, (1991, 1997)
<i>Aeschynomene virginica</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		Australia	TeBeest y Templeton, 1985.
<i>Ageratina riparia</i>	<i>Entyloma ageratinae</i>	Zonas infestada	EUA	Barreto y Evans, 1988; Morris, 1991; Barton, 2004; Trujillo, 2005.
<i>Chondrilla juncea</i>	<i>Puccinia chondrillina</i>	Varios cultivos y zonas infestadas	EUA	Hasan, 1981; Burdon <i>et al.</i> , 1981; Cullen, 1985; Supkoff <i>et al.</i> , 1988.
<i>Cryptostegia</i> Roxb, ex R. Br	<i>Maravalia cryptostegiae</i>	Varios cultivos	Australia	Evans, 1993; Evans y Tomley, 1996; Tomley <i>et al.</i> , 2003.
<i>Senna surattensis</i>	<i>Acremonium sp.</i>	Zonas infestadas	EUA	Trujillo, 2005.

<i>Passiflora tarminiana</i>	<i>Septoria passiflorae</i>	Varios cultivos y zonas infestadas	EUA-Australia	Trujillo, 2005.
<i>Rubus spp</i>	<i>Phragmidium violaceum</i>	Zonas infestadas	Australia	Oehrens, 1977; Bruzzese, 1995.
<i>Abutilon theophrasti</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Varios cultivos	Canadá	DiTommaso <i>et al.</i> , 1996.
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	<i>Nimbya alternantherae</i>	Cuerpos de agua	Brasil-EUA	Barreto <i>et al.</i> 2000.
<i>Amaranthus sp.</i>	<i>Phomopsis amaranthicola</i> <i>Alternaria alternata</i>	Hortalizas	EUA	Roskopf, 1998.
<i>Avena fatua</i>	<i>Drechslera avenacea</i>	Varios cultivos	Australia-Italia	Vutro <i>et al.</i> , 1999.
<i>Calystegia sepium</i>	<i>Stagonospora convolvuli</i>	Varios cultivos	Europa	Guntli <i>et al.</i> , 1999.
<i>Cirsium arvense</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i> <i>Phoma cirsii</i>	Varios cultivos	EUA	Leth y Andreasen, 1999.
<i>Chenopodium album</i>	<i>Ascochyta caulina</i>	Varios cultivos	Holanda	Scheepens <i>et al.</i> , 1997
<i>Convolvulos arvensis</i>	<i>Stagonospora convolvuli</i>	Varios cultivos	Europa	Pfirter <i>et al.</i> , 1997
<i>Cyperus rotundus</i>	<i>Dactylaria higginsii</i> <i>(Pyricularia higginsii)</i> <i>Cercospora caricis</i>	varios cultivos	EUA Israel	Kadir y Charudattan, 2000. Dinoor <i>et al.</i> 1999. Ribeiro <i>et al.</i> , 1999.
<i>Cytisus scoparius</i>	<i>Fusarium tumidum</i>	Plantaciones de arboles	Nueva Zelanda	Fröhlich <i>et al.</i> , 1999.
<i>Echinochloa crus-galli</i>	<i>Exserohilum fusiforme</i> <i>E. monoceras</i>	Varios cultivos	Vietnam-Australia	Van Tuat <i>et al.</i> , 1998.
<i>Echinochloa sp.</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>		Canadá y corea del sur	Watson, 1997; Yang <i>et al.</i> , 2000.

<i>Egeria densa; E. najas</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Hidroeléctricas	Brasil	Nachtigal and Pitelli, 1999.
<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Alternaria eichhorniae</i>	Lagos y canales de riego	EUA Egipto	Vincent and Charudattan, 1999.
<i>Erythroxylum coca</i>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>erythroxyli</i>	Plantaciones de coca	Regiones productoras de coca	Hebbar <i>et al.</i> , 1999. Sands <i>et al.</i> , 1997.
<i>Euphorbia heterophylla</i>	<i>Bipolaris euphorbiae</i>	Varios cultivos	Brasil	R.A. Pitelli, comunicación personal.
<i>Galinsoga ciliata</i> <i>G. parviflora</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Varios cultivos	Rusia	Gasich y Titova, 1998.
<i>Hakea sericea</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Plantaciones de arboles	Sudáfrica	Morris <i>et al.</i> , 1999.
<i>Hakea sericea</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bosques de Hawái	EUA	Anderson y Gardner, 1999
<i>Imperata cylindrica</i>	<i>Colletotrichum caudatum</i>	Varios cultivos	Malasia	Caunter y Lee, 1996 Yandoc <i>et al.</i> , 1999
	<i>Drechslera gigantea</i> <i>Bipolaris sacchari</i>		EUA	
<i>Orobanche sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	En campos de cereales	Sudan Alemania	Kroschel <i>et al.</i> , 1999
<i>Rottboellia cochinchinensis</i>	<i>Sporisorium ophiuri</i>	En campos de cereales	Tailandia y ucrania	Reeder <i>et al.</i> , 1996
	<i>Colletotrichum graminicola</i>			
<i>Sagittaria sp.</i>	<i>Rhynchosporium alismatis</i>	Arroz	Australia	Cother <i>et al.</i> , 1999
<i>Senna obtusifolia</i>	<i>Alternaria cassiae</i>	Campos de soya	Brasil	Pitelli, comunicación personal.
<i>Sesbania exaltata</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i>	Campos de soya y arroz	EUA	Boyette <i>et al.</i> , 1999
<i>Solanum viarum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Cítricos	EUA	DeValerio <i>et al.</i> , 2000.
<i>Sphenoclea zeylanica</i>	<i>Alternaria sp.</i>	Campos de arroz	Filipinas	Masangkay <i>et al.</i> , 1996 Caunter y Lee, 1996.
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		Malasia	
<i>Striga hermonthica</i>	<i>Fusarium nygamai</i>	Varios cultivos	Alemania,	Kroschel <i>et al.</i> , 1999.

	<i>Fusarium oxysporum</i>		Canadá,	Ciotola <i>et al.</i> ,
	<i>Fusarium semitectum</i> var. <i>majus</i>		África	1995.
<i>Taraxacum officinale</i>	Aislamiento MAC 1	Jardines	Canadá	Schnick <i>et al.</i> ,
				1998.
<i>Trianthema portulacastrum</i>	<i>Gibbago trianthema</i>	Varios cultivos	India	Aneja <i>et al.</i> ,
				1999.
<i>Ulex europaeus</i>	<i>Fusarium tumidum</i>	varios cultivos	Nueva Zelandia	Fröhlich <i>et al.</i> ,
				1999.
Varias Malezas anuales	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Varios cultivos	EUA	Maryland Walker y Tilley, 1997.
Varias malezas	<i>Drechslera gigantea</i>	Cítricos	EUA	Chandramohan, 1999
<i>Pueraria lobata</i>	<i>Myrothecium verrucaria</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i>	Bordes de carreteras	EUA	C.D. Boyette, USDA-ARS, Stoneville, MS Zidack y Backman, 1996.
Varias malezas de la familia Asterácea	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	Varios cultivos	EUA Canadá	Johnson <i>et al.</i> , 1996.
<i>Xanthium</i> sp	<i>Alternaria zinniae</i> <i>Colletotrichum orbiculare</i>	Varios cultivos	EUA Australia	USA Auld <i>et al.</i> , 1992; Abbas, 1998.
<i>Acroptilon repens</i>	<i>Subanguina picridis</i>		Canadá	Ou y Watson, 1992, 1993.
<i>Cirsium arvense</i> y <i>Ranunculus acris</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pastizales	Nueva Zelandia	Hurrell <i>et al.</i> , 2001; Bourdöt <i>et al.</i> , 2004.
<i>Clidemia hirta</i>	<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>clidemiae</i>	Zonas infestadas	EUA	Trujillo, 2005.
<i>Cuscuta campestris</i>	<i>Alternaria cuscutacidae</i>			Templeton, 1982.
<i>Cuscuta chinensis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>cuscutae</i>	Varios cultivos	China	Templeton, 1982; Wang, 1989.
<i>Cyperus esculentus</i>	<i>Puccinia canaliculata</i>	Zonas infestadas y varios cultivos	Holanda	Phatak <i>et al.</i> , 1983; Bruckart <i>et al.</i> , 1988; Scheepens y Hoogerbrugge, 1991.
<i>Diospyros virginiana</i>	<i>Acremonium diospyri</i>			Templeton, 1982.

<i>Hedychium gardnerianum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>		EUA	Anderson y Gardner, 1999.
<i>Malva pusilla</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Varios cultivos	Canadá	Mortensen y Makowski, 1997.
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	<i>Nothanguina phyllobia</i>	Varios cultivos	EUA	Robinson <i>et al.</i> , 1978.

Aislamientos con potencial para agentes de control biológico

Maleza	Aislamiento	Cultivo	País	Referencia
<i>Asparagus asparagoides</i>	<i>Puccinia myrsiphylli</i>	Zonas infestadas	Australia	Batchelor <i>et al.</i> (2004)
<i>Baccharis halimifolia</i>	<i>Puccinia evadens</i>	Varios cultivos	Australia	Verma <i>et al.</i> , 1996; Tomley y Willsher, 2002.
<i>Carduus nutans</i>	<i>Puccinia carduorum</i>	Varios cultivos	EUA	Baudoin y Bruckart, 1996.
<i>Centaurea solstitialis</i>	<i>Puccinia jaceae</i>	Varios cultivos	EUA	Bruckart, 1989; Shishkoff y Bruckart, 1993; Suszkiw, 2004.
<i>Lantana camara</i>	<i>Mycovellosiella lantanae</i>	Zonas infestadas	EUA	den Breejën, 2004; Trujillo, 2005.
<i>Mimosa pigra</i>	<i>Sphaerulina mimosae-pigrae</i>	Varios cultivos	Australia	Seier y Evans, 1996; Julien y Griffiths, 1998.
<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Albugo amaranthi</i>	Varios cultivos	Europa	Jüttersonke, 1998.
<i>Cyperus esculentus</i>	<i>Puccinia canaliculata</i>	Varios cultivos	EUA	Phatak <i>et al.</i> , 1987.
<i>C. rotundus</i>	<i>Puccinia romagnoliana</i>		Israel	Bedi and Grewal, 1999.
<i>Senecio vulgaris</i>	<i>Puccinia lagenophorae</i>	Varios cultivos	Europa	Müller-Schärer y Frantzen, 1996.
<i>Sorghum halepense</i>	<i>Sporisorium cruentum</i> (<i>Sphacelotheca holci</i> ; <i>S. cruenta</i>)	Varios cultivos	EUA	Massion y Lindow, 1986.
<i>Rosa multiflora</i>	Rose rosette disease	Granjas	EUA	Epstein <i>et al.</i> , 1997.

<i>Rottboellia cochinchinensis</i>	<i>Sporisorium ophiuri</i>	Cultivos de cereales	Ucrania	Reeder <i>et al.</i> , 1996
------------------------------------	----------------------------	----------------------	---------	-----------------------------

Agentes de control biológico usados en combinación con insectos

Maleza	Aislamiento	Cultivo	País	Referencia
	<i>Acremonium zonatum</i>			
<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Alternaria eichhorniae</i>	Lagos canales de riego y presas	Egipto Sudáfrica USA	Den Breeÿen, 1999. Vincent y Charudattan, 1999. Shabana <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Cercospora piaropi</i> - <i>Neochetina bruchi</i> ; <i>N. eichhorniae</i> y otros insectos			
<i>Euphorbia esula</i>	<i>Fusarium</i> sp.; <i>Rhizoctonia</i> sp <i>Aphthona</i> sp.; otros insectos	En campo	EUA	Caesar, 1999.
Varias malezas	<i>Rhizobacteria</i> como antagonista de malezas	Varios sitios	EUA	Kremer y Kennedy, 1996. Boyetchko <i>et al.</i> , 1999.

Aislamientos con potencial para acb aun por verificar

Maleza	Aislamiento	Cultivo	País	Referencia
<i>Ageratina adenophora</i>	<i>Phaeoramularia eupatorii-odorati</i>	Varios cultivos	Sudáfrica	Morris, 1991.
<i>Carduus pycnocephalus</i>	<i>Puccinia cardui-pycnocephali</i>	Zonas infestadas	EUA	Baudoin <i>et al.</i> , 1993; Bruckart <i>et al.</i> , 1996.
<i>Cirsium arvense</i>	<i>Puccinia punctiformis</i>	Varios cultivos	Holanda	Frantzen, 1994.
<i>Clematis vitalba</i>	<i>Phoma clematidina</i>	Varios cultivos	Nueva Zelanda	Gourlay <i>et al.</i> , 2000.
<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Cercospora piaropi</i>	Presas	EUA	Charudattan <i>et al.</i> , 1985; Charudattan, 2001.
<i>Galega officinalis</i>	<i>Uromyces galegae</i>	Zonas infestadas y varios cultivos	Europa	Oehrens y Gonzalez, 1975.
<i>Heliotropium europaeum</i>	<i>Uromyces heliotropii</i>	Varios cultivos	Australia	Barton, 2004; Julien y Griffiths, 1998.
<i>Mimosa pigra</i>	<i>Diabole cubensis</i>	Varios cultivos	Australia	Seier y Evans, 1996; Julien y Griffiths, 1998.

*Parthenium
hysterophorus*

Puccinia abrupta var.
partheniicola

Varios cultivos

Australia

Julien y Griffiths,
1998.

Tomado de Charudattan, 2005 y 2001b.

Para el desarrollo comercial de un potencial acb de tipo aumentativo, primero se debe seleccionar al candidato probando su patogenicidad sobre la maleza objetivo cumpliendo con los postulados de Koch; a continuación se evalúa su rango de hospedantes, incluyendo tanto especies cultivables como silvestres. Cuando éste es muy amplio, el aislamiento no tiene potencial, pero si el rango es reducido, se procede entonces a determinar las condiciones que favorecen su producción masiva (substratos alimenticios y condiciones de temperatura, entre otros), su inocuidad en humanos, se realizan pruebas en parcelas experimentales y se desarrollan las metodologías para su formulación y posible comercialización (Charudattan, 20005). Una vez que se demuestra que el aislamiento satisface estos requerimientos, se le puede entonces considerar como un potencial acb para el desarrollo de un **Micoherbicida**.

Los micoherbicidas generalmente contienen propágulos del acb en latencia, los cuales al suspenderse en agua se reactivan y tiene la capacidad de inducir enfermedad sobre la maleza objetivo. Estos productos son llamados así debido a que su efecto es comparable con el de herbicidas y han tenido un gran auge principalmente en Australia, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos (Cuadro 5) (Charudattan, 2005, 2001a, 2001b, 2001c, 1996; Charudattan y Dinooor, 2000; Julien y Griffiths, 1998; Julien y White, 1997). Cabe señalar que para el caso de malezas acuáticas, aun no se reportan micoherbicidas a pesar de contar con aislamientos caracterizados como acb.

Cuadro 5. Micoherbicidas comerciales.

Nombre del producto	Patógeno	Maleza	Referencia
Smolder®	<i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta gronovii</i>	Bewick, <i>et al.</i> , 1987; Hopen <i>et al.</i> , 1997.
Chontrol® MycoTech® BioChon®	<i>Chondrostereum purpureum</i>	tocones de árboles de hoja ancha	de Jong, 2000; Becker <i>et al.</i> , 2005.
BioMal®	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Malva pusilla</i>	Charudattan, 2005;
Collego®	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i>	<i>Aeschynomene virginica</i> (L.) B.S.P.	Charudattan y Dinooor, 2000 Charudattan, 2005;
Stumpout®	<i>Cylindrobasidium laeve</i>	<i>Acacia mearnsii</i> y <i>Acacia pycnatha</i>	Charudattan y Dinooor, 2000 Charudattan, 2005;
DeVine®	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>	Charudattan y Dinooor, 2000 Charudattan, 2005;
Dr. BioSedge®	<i>Puccinia canaliculata</i>	<i>Cyperus esculentus</i>	Charudattan y Dinooor, 2000 Charudattan, 2005;
Dyer´s woad rust strain Woad 006489®	<i>Puccinia thlaspeos</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	Charudattan y Dinooor, 2000 Charudattan, 2005;
Camperico®	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Poa annua</i>	Charudattan y Dinooor, 2000

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Pruebas de patogenicidad “*in vitro*”.

En hojas asintomáticas desprendidas de plantas de tule, se probó la patogenicidad de los aislamientos *Mucor* sp., *Peyronellaea glomerata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium* sp., cepas 2.5 y 2.6 de *Alternaria alternata* y TS1 obtenidos de hojas de tule con lesiones necróticas provenientes de Culiacán, Sinaloa; Cuautitlán Izcalli, Edo. de México; y Xochimilco, D.F. (Silva *et al.*, 2011). Puntas de hifas de los aislamientos mencionados se cultivaron en medio PDA (Papa dextrosa agar) y *P. glomerata* en V₈A (jugo V8 agar), las cajas se incubaron en oscuridad a 26 °C y a los 12 días se vertieron sobre el medio de cada caja 20 ml de solución salina al 0.9% + 25 ppm tween 20, se raspó la superficie para suspender los propágulos y la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm; se cuantificó el número de propágulos en un hematocitómetro y se ajustó el nivel de inóculo a 10⁶ ufc. La suspensión se asperjó sobre las hojas y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 60% de humedad y 27°C. El experimento se repitió dos veces.



Figura 2. Prueba de patogenicidad *in vitro* de hongos asociados al tule. A) Bioensayo establecido para inocular hojas desprendidas. B) Incubación en cuarto de crecimiento.

Para determinar el porcentaje de incidencia se usó como base la fórmula propuesta por Hernández *et al.* (2004), con las siguientes modificaciones: I(%)= incidencia de hojas enfermas; ni= número de hojas enfermas en cada tratamiento; Nj= número total de hojas en cada tratamiento.

$$I(\%) = \left(\frac{ni}{Nj} \right) * 100$$

La virulencia de cada aislamiento se evaluó con una escala numérica de 0 a 3, tomando como base la propuesta por Martínez y Charudattan (1998), donde: 0 = hoja sana, sin síntomas (aislamiento no patogénico); 1= hasta 7 lesiones cloróticas con leve necrosis en algunas hojas (aislamiento ligeramente virulento); 2= lesiones necróticas abundantes pero sin muerte de la hoja (aislamiento moderadamente virulento); y 3 = hoja con lesiones necróticas abundantes y extensivas que causan su muerte (aislamiento altamente virulento). Una vez inoculadas las hojas de tule se realizaron observaciones cada 6 h durante 15 días, registrándose los síntomas manifestados.

Pruebas de patogenicidad en planta adulta de *Typha domingensis*

Con base en los resultados del ensayo “*in vitro*” se seleccionó a la cepa con mayor virulencia al tule y se procedió a inocular plantas adultas asperjando dos niveles de inóculo (10^4 y 10^6 ufc). Durante 4 meses se mantuvieron bajo observación en condiciones de invernadero para registrar la aparición de síntomas y el desarrollo de la enfermedad.

Pruebas de rango de hospedante

Se evaluó la respuesta de 43 diferentes variedades de hortalizas y tres variedades de maíz a la inoculación con el hongo seleccionado. En bolsas de polietileno se sembraron 160 semillas de cada cultivar, una vez emergidas las plántulas se asperjaron con 10^4 ó 10^6 ufc del patógeno; se

mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 27°C y 2 semanas después se evaluó la respuesta de los cultivares utilizando una escala numérica de 0-3, donde: 0= planta sin síntomas (cultivar inmune); 1= planta hasta con 12 lesiones cloróticas y algunas con necrosis leve (cultivar ligeramente susceptible); 2= planta con lesiones necróticas abundantes pero la planta no muere (cultivar moderadamente susceptible); 3= planta con lesiones necróticas abundantes y la planta muere (cultivar altamente susceptible).



Figura 3. Prueba de rango de hospedantes del aislamiento TS1.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables virulencia e incidencia en las pruebas de patogenicidad “*in vitro*” se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias

con el método de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

Identificación morfológica y molecular de TS1

Para identificar a la cepa TS1, que resultó ser la más virulenta, se cultivó el hongo sobre tejido foliar esterilizado de tule y se mantuvieron a 25 °C durante un mes, tiempo en el cual se observó la formación de estructuras esféricas de color negro sobre los residuos de hoja. Se realizaron cortes longitudinales de las estructuras y se montaron en portaobjetos para su observación en microscopio compuesto. De las estructuras desarrolladas se obtuvieron los conidios, se sembraron en placas con PDA y se obtuvieron cepas puras.

Para el análisis molecular se extrajo DNA genómico siguiendo el protocolo descrito por Skroch y Nienhuis (2000). Se extrajo DNA de los siguientes aislamientos: 1) TS1 reactivado; 2) TS1-ppi, re-aislado de las plantas de la prueba de patogenicidad en invernadero; 3) TS1-rh, re-aislado de plantas de la prueba de rango de hospedantes; 4) TS1-ccr, obtenido a partir de conidios provenientes de las fructificaciones desarrolladas *in vitro*, en los residuos de hojas de tule de la cepa reactivada (TS1); y 5) TS1-cppi; obtenido a partir de conidios provenientes de las fructificaciones desarrolladas *in vitro* del aislamiento re-aislado de las plantas de la prueba de patogenicidad en invernadero. El DNA de cada cepa se utilizó para amplificar tanto la región ITS1-5.8s-ITS2 del DNA ribosomal, con los iniciadores universales ITS1F e ITS4R (White *et. al.*, 1990), como el cuarto intrón del gen *tef1* con los iniciadores EF1-728F y EF1-986R (Carbone y Konh, 1999).

La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 25 μ l, conteniendo agua libre de DNAsas, buffer de reacción 1X, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1U de Taq DNA polimerasa, 1 μ M de cada

iniciador y 100 ng de DNA. La reacción se llevó a cabo usando un termociclador Techne® modelo TC-512, para los iniciadores universales ITS1F e ITS4R las condiciones fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min., 30 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 60s y una extensión final a 72°C por 10 min; y para los iniciadores EF1-728F y EF1-986R las condiciones fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 8 min, 35 ciclos a 95°C por 15s, 55.3°C por 20s y 72°C por 60s y una extensión final de 72°C por 5 min. Los productos obtenidos se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System y se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Análisis de secuencias de DNA

Las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron mediante el programa Mega 6 y se compararon con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI mediante la herramienta Blast. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético usando el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987) con un re-muestreo de 5000 réplicas con secuencias relacionadas con la obtenida.

IV. RESULTADOS

En condiciones *in vitro* los aislamientos *A. alternata* 2.5, *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *P. glomerata*, *P. expansum* y TS1, fueron patogénicos al tule; este último destacó por su mayor incidencia, alto grado de virulencia y agresividad (Cuadro 6) (Figura 4). TS1 provocó la aparición de síntomas a los 2 días posteriores a la inoculación y a los ocho había causado una necrosis extensiva y muerte de la hoja; a los 10 se observó que la hoja se cubría de micelio (Figura 5).

Cuadro 6. Virulencia y desarrollo de síntomas y signos de aislamientos fúngos inoculados en hojas desprendidas de tule (*Typha domingensis* Pers.).

Aislamiento	Síntomas, signos, y tiempo en que aparecieron			%Incidencia ^y	Virulencia ^z
	Clorosis	Amarilleamiento	Necrosis		
TS1	(+) 2 dpi.	(+) 4-5 dpi Micelio	(+) 8 dpi Diferenciación de células pseudoparenquimatosas	81.3 (±3.2) a	2.7 (±0.9) a
<i>Alternaria alternata</i> 2.5	(+) 3 dpi Micelio	(+) 8-10 dpi Micelio	(+) 12-14 dpi Conidióforos y conidia	68.3 (±2.8) b	2.2 (±1.2) ab
<i>Cladosporium</i> sp.	(+) 5 dpi Micelio	(+) 8-9 dpi Micelio Conidióforos y conidia	(+) 13-15 dpi Conidióforos y conidias.	56.6 (±2.8) c	1.5 (±0.5) bc
<i>Mucor</i> sp.	(+) 7 dpi Micelio	(+) 11-13 dpi Micelio y diferenciación del esporangióforo	(+) 13-16 dpi Esporangióforo y esporangiosporas	55.0 (±2.8) c	1.0 (±0.0) cd
<i>Peyronellaea glomerata</i>	(+) 4 dpi Asg	(+) 8-9 dpi Micelio y diferenciación de picnidios y conidia	(+) 14-16 dpi Picnidios y conidia	53.3 (±5.7) c	1.0 (±0.8) cd
<i>Penicillium expansum</i>	(-) Asg	(+) 13-15 dpi Micelio	(-) Asg	51.6 (±5.0) c	0.0 (±0.0) d
<i>Aspergillus niger</i>	(-) Asg	(-) Asg	(-) Asg	0.0 (±0.0) d	0.0 (±0.0) d
<i>Alternaria alternata</i> 2.6	(-) Asg	(-) Asg	(-) Asg	0.0 (±0.0) d	0.0 (±0.0) d

(+): síntoma presente; (-): síntoma no presente; dpi: días posteriores a la inoculación; Asg: ausencia de signos. ^ySe estimó mediante la fórmula propuesta por Hernández *et al.* (2004); cada valor representa el promedio de los tres experimentos realizados; ^zSe evaluó con una escala de 0 a 3, donde 0=aislamiento no patogénico y 3=aislamiento altamente virulento y cada valor representa el promedio de 16 repeticiones (hojas). Valores en cada columna con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$).

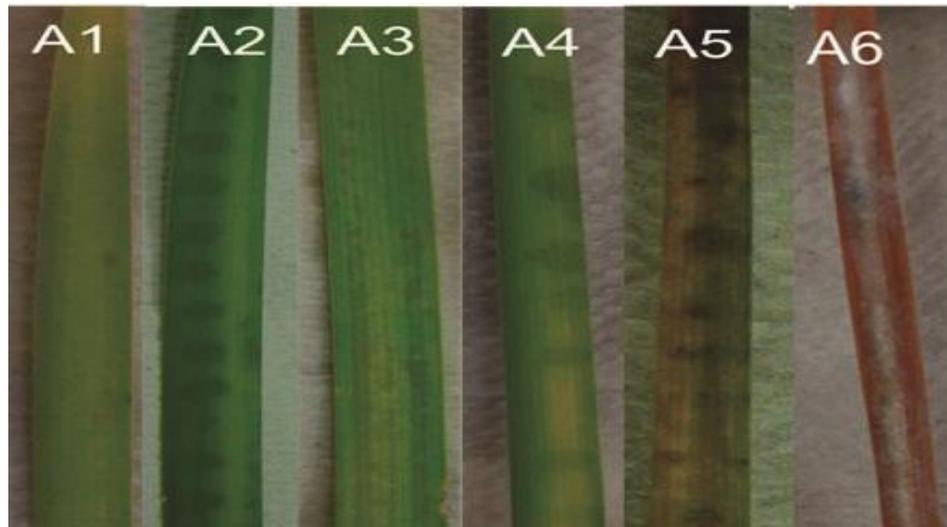


Figura 4. Síntomas inducidos por: *Mucor* sp. (A1), *P. expansum* (A2), *P. glomerata* (A3), *Cladosporium* sp. (A4), *A. alternata* 2.5 (A5) y TS1 (A6) en hojas desprendidas de tule.



Figura 5. Síntomas inducidos por el aislamiento TS1. A) Testigo; B) Progreso del desarrollo de síntomas en hoja desprendida de tule; C) Crecimiento micelial sobre lesión necrótica y diferenciación de células pseudoparenquimatosas. ↑ pi= posteriores a la inoculación.

En plantas adultas inoculadas con el mayor nivel de inóculo (10^6 ufc) de TS1, los síntomas típicos de la enfermedad empezaron a aparecer a los 10 días posteriores a la inoculación. Al cabo de un mes se presentó muerte de hojas y tallos, sin embargo, los rizomas no mostraron ningún daño aparente y se observó la emergencia de varios brotes (Figura 6). Con el nivel de inóculo bajo (10^4 ufc), se observaron síntomas de la enfermedad un mes después de la inoculación y la muerte de hojas y tallos se presentó hasta los 3 meses posteriores a la inoculación (Cuadro 7).

Cuadro 7. Desarrollo de síntomas, tiempo en que aparecieron (dpi, días posteriores a la inoculación) y signos en plantas adultas de tule (*Typha domingensis* Pers.) inoculadas con dos niveles de propágulos del aislamiento TS1.

Aislamiento		Nivel de propágulos	
TS1	10^4		10^6
Clorosis	(+) 18-22 dpi		(+) 10 dpi
Amarillamiento	(+) 35-48 dpi		(+) 15-18 dpi
Necrosis	(+) 70-80 dpi		(+) 25- 30 dpi
Signos	Diferenciación del micelio en células pseudoparenquimatosas		Diferenciación del micelio en células pseudoparenquimatosas y conglomerados de micelio
Incidencia	70-85 %		70-85 %

(+): Síntoma presente; (-): Síntoma no presente; dpi: días posteriores a la inoculación.

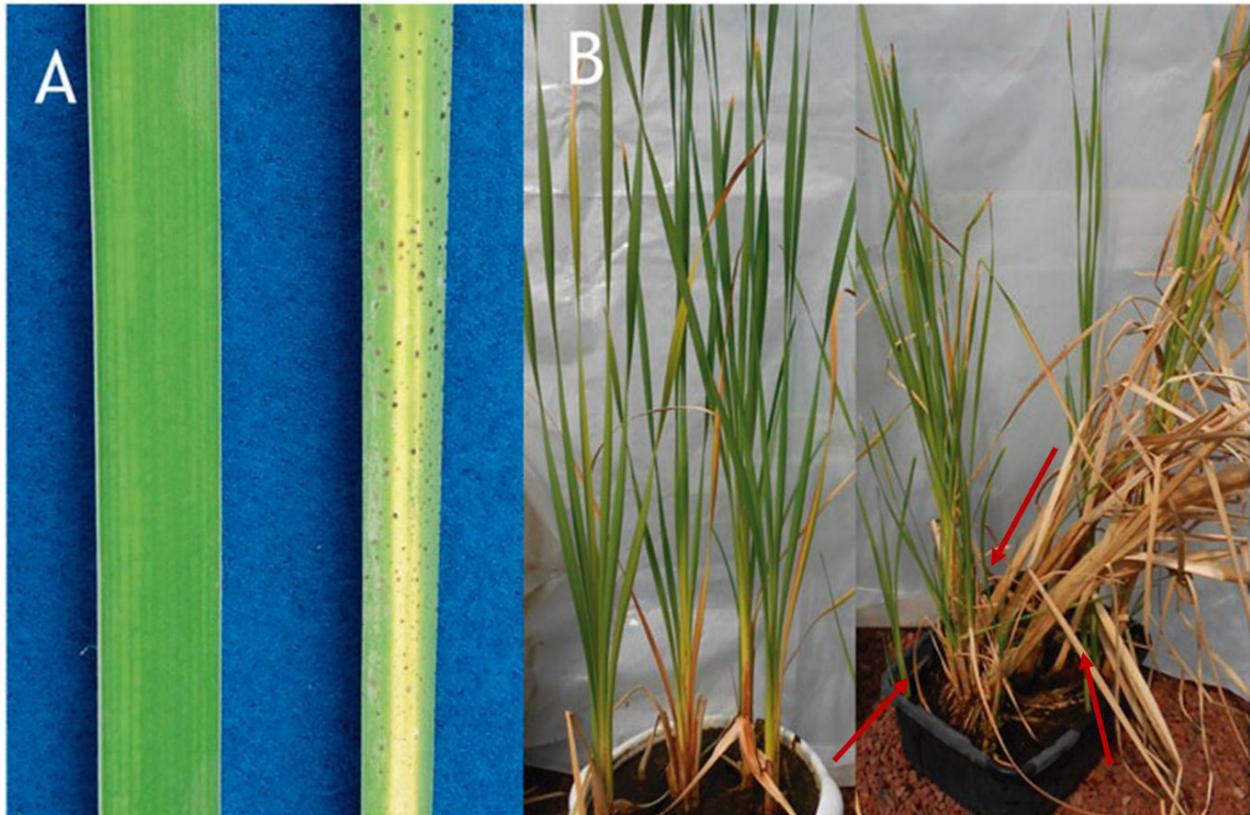


Figura 6. Patogenicidad de TS1 en planta adulta. A) Hoja no inoculada (izquierda) y hoja inoculada (derecha); B) Plantas no inoculadas (izquierda) y plantas inoculadas (derecha); ↑ brotes producidos por los rizomas de las plantas enfermas.

Los resultados de la prueba de rango de hospedantes indicaron que la espinaca fue altamente susceptible, ya que todas las plantas inoculadas murieron, en cambio las plantas de sandía, melón, cilantro, chícharo, y la col de bruselas fueron moderadamente susceptibles (Cuadro 8). En contraste, en las plantas de alcachofa se observó la presencia de pequeñas lesiones cloróticas y ocasionalmente necróticas de las cuales no se logró aislar al patógeno, por lo tanto, esta hortaliza se clasificó como resistente a TS1. Para los 40 cultivares restantes no se apreció el desarrollo de síntomas, ni de algún otro tipo de respuesta a la inoculación con TS1 y por lo tanto se consideraron como plantas inmunes (Cuadro 8) (Figura 7).

Cuadro 8. Especies de plantas inoculadas con dos niveles de propágulos (10^4 y 10^6 ufc) de TS1 en la prueba rango de hospedantes.

Familia	Nombre común/especie ^z	Severidad ^y		Incidencia (%)	
		10^6	10^4	10^6	10^4
Amaranthaceae	Acelga (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>)	I	I	-	-
	Betabel (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>Detroit</i>)	I	I	-	-
	Epazote (<i>Chenopodium ambrosioides</i>)	I	I	-	-
	Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> var. <i>Viroflay</i>)	S3	S3	100	100
Amaryllidaceae	Cebolla cristal (<i>Allium cepa</i> var. <i>cristal</i>)	I	I	-	-
	Cebolla roja (<i>Allium cepa</i> var. <i>Red Burgundy</i>)	I	I	-	-
	Cebollín (<i>Allium cepa</i> var. <i>Aggregatum</i>)	I	I	-	-
	Porro (<i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i>)	I	I	-	-
Apiaceae	Eneldo (<i>Anethum graveolens</i> var. <i>Mammoth</i>)	I	I	-	-
	Apio (<i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i>)	I	I	-	-
	Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	S2	S2	61.2	36.2
	Perejil (<i>Petroselinum crispum</i>)	I	I	-	-
Asteraceae	Zanahoria (<i>Daucus carota</i> var. <i>sativus</i>)	I	I	-	-
	Alcachofa (<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>)	R	R	12.5	5
	Lechuga baby black (<i>Lactuca sativa</i>)	I	I	-	-
	Lechuga orejona (<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>)	I	I	-	-
	Lechuga romana (<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>)	I	I	-	-
	Lechuga italiana (<i>Lactuca sativa</i>)	I	I	-	-
	Manzanilla (<i>Chamaemelum nobile</i>)	I	I	-	-
Asparagaceae	Esparrago (<i>Asparagus officinalis</i> var. <i>Marry Washington</i>)	I	I	-	-
Brassicaceae	Arugúla (<i>Eruca sativa</i>)	I	I	-	-
	Berro (<i>Nasturtium officinale</i>)	I	I	-	-
	Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	I	I	-	-
	Col de bruselas (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>)	S2	S2	63.7	43.7
	Col (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Copenhagen market</i>)	I	I	-	-
	Coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	I	I	-	-
	Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	I	I	-	-
Cucurbitaceae	Calabaza italiana (<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>italiana</i>)	I	I	-	-
	Melón (<i>Cucumis melo</i> var. <i>Top mark</i>)	S1	S1	32.5	42.5
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	I	I	-	-
	Sandia (<i>Citrullus lanatum</i> var. <i>Charleston grey</i>)	S1	S1	15	20
Fabaceae	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Strike</i>)	I	I	-	-
	Jícama (<i>Pachyrhizus erosus</i> var. <i>Cristal</i>)	I	I	-	-
	Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	S2	S2	55	27.5

Lamiaceae	Albahaca de hoja ancha (<i>Ocimum basilicum</i>)	I	I	-	-
	Orégano (<i>Lippia graveolens</i> var. <i>berlandieri</i>)	I	I	-	-
Solanaceae	Jitomate bola (<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>Floradade</i>)	I	I	-	-
	Jitomate cherry (<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>)	I	I	-	-
	Jitomate saladette (<i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>Rio grande</i>)	I	I	-	-
	Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> var. <i>Caribe orange</i>)	I	I	-	-
	Chile jalapeño (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>)	I	I	-	-
	Chile serrano (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>Tampiqueño</i>)	I	I	-	-
	Pimiento morrón (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>California wonder</i>)	I	I	-	-
Poacea	Maíz variedad OU2C (<i>Zea mays</i>)	I	I	-	-
	Maíz variedad OU3C C-2006T (<i>Zea mays</i>)	I	I	-	-
	Maíz variedad V-53A SL 2007R (<i>Zea mays</i>)	I	I	-	-

²Cultivares económicamente importantes comúnmente producidas cerca de los canales de riego; I: Plantas inmunes; R: Plantas resistentes; S1: Plantas ligeramente susceptibles; S2: plantas moderadamente susceptibles; S3: Plantas altamente susceptibles. Cada cultivar se evaluó en macetas de 15 x 15 cm con 20 plantas/macetas, con cuatro repeticiones. ³La severidad se evaluó con una escala de 0 a 3 donde; 0=plantas inmunes y 3=plantas altamente susceptibles.

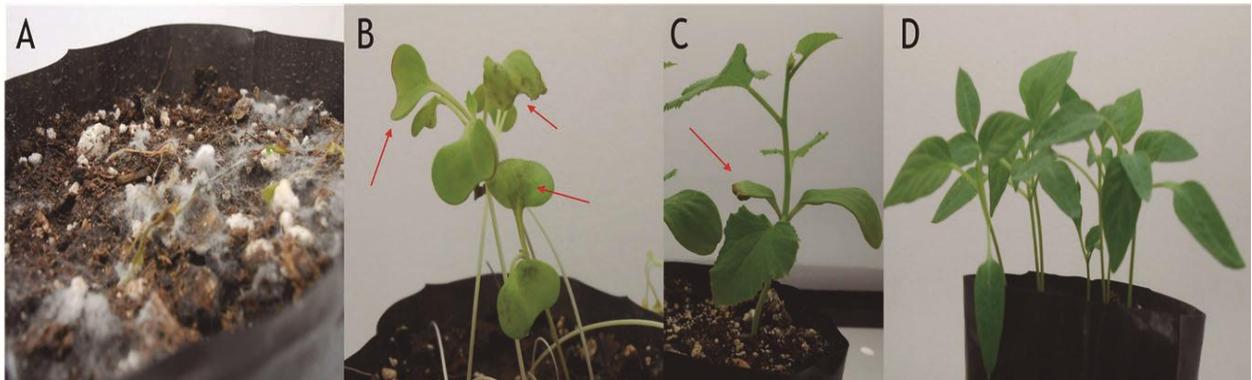


Figura 7. Respuesta de cultivares a la inoculación con TS1. A) Altamente susceptible (planta de espinaca), completamente colonizada por el hongo; B) Moderadamente susceptible (hojas de col de bruselas con lesiones necróticas); C) Ligeramente susceptible (planta de melón, dos a tres hojas con lesiones incipientes); D) Inmune (planta de chile jalapeño, sin síntomas).

En condiciones *in vitro*, sobre el tejido foliar de tulle esterilizado, se desarrolló micelio de color gris, creciendo de manera profusa entre el tejido de la hoja y a los 10 días se observaron

conglomerados de micelio que se tornaron oscuros. A los 17 días los conglomerados se constituyeron en estructuras redondas de color negro y a los 24 fue evidente la presencia de cuerpos fructíferos de formada esférica, por lo general separados e inmersos en el tejido de la hoja de tule y fuertemente esclerosados (Figura 8).

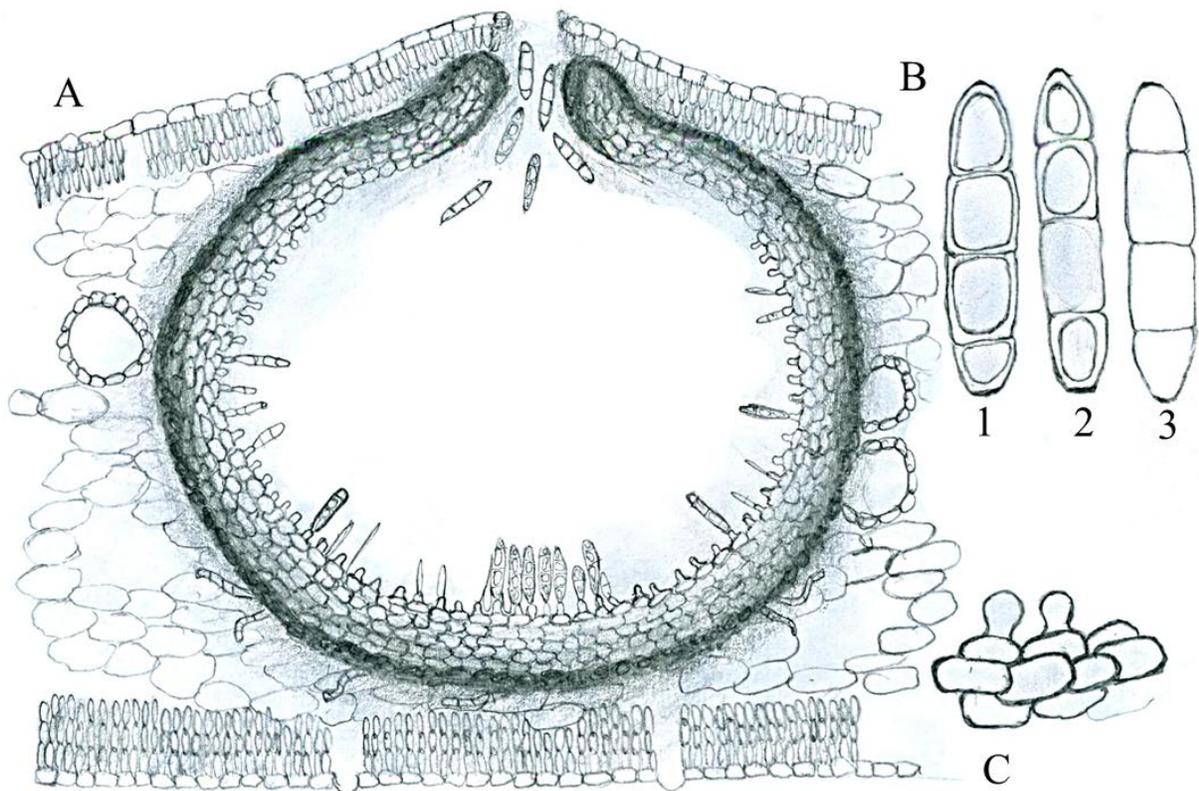


Figura 8. Formación de cuerpos fructíferos inmersos en el tejido foliar del tule esterilizado tras la inoculación de TS1. A) Representación esquemática del picnidio desarrollado en tejido foliar; B) Tipo de conidios: 1. Conidio inmaduro con cuatro septos gatulados, 2. Conidio en proceso de maduración, 3. Conidio maduro; C) Células conidiógenas.

En los montajes realizados se apreció que la fructificación correspondiente a un picnidio subgloboso de 360–380 μm de diámetro (Figura 9B y 9C) con un ostiolo central ligeramente papilado de 18–20 μm (Figura 9D). Las paredes del picnidio están compuestas por aproximadamente seis filas de células siendo las exteriores de color negro, las intermedias de color

marrón y las interiores de color marrón claro; en las paredes del interior, se observó una vasta cantidad de células conidiógenas de 4–6 μm de alto y de ancho, aplanadas en el ápice, mamiliformes y hialinas. Las conidias son producidas de manera abundante con un arreglo tipo uniseriado, en dirección al ostiolo (Figura 9E), son elipsoidales con los extremos ligeramente truncados, paredes lisas, con 3–4 septos gatulados y miden de (38-) 43-49 (-54) x 7-9 (-10) μm x 7-9 (-10) μm (Figura 9F). Todas estas características son consistentes con las reportadas para el anamorfo *Stagonospora* sp. del género *Saccharicola*.

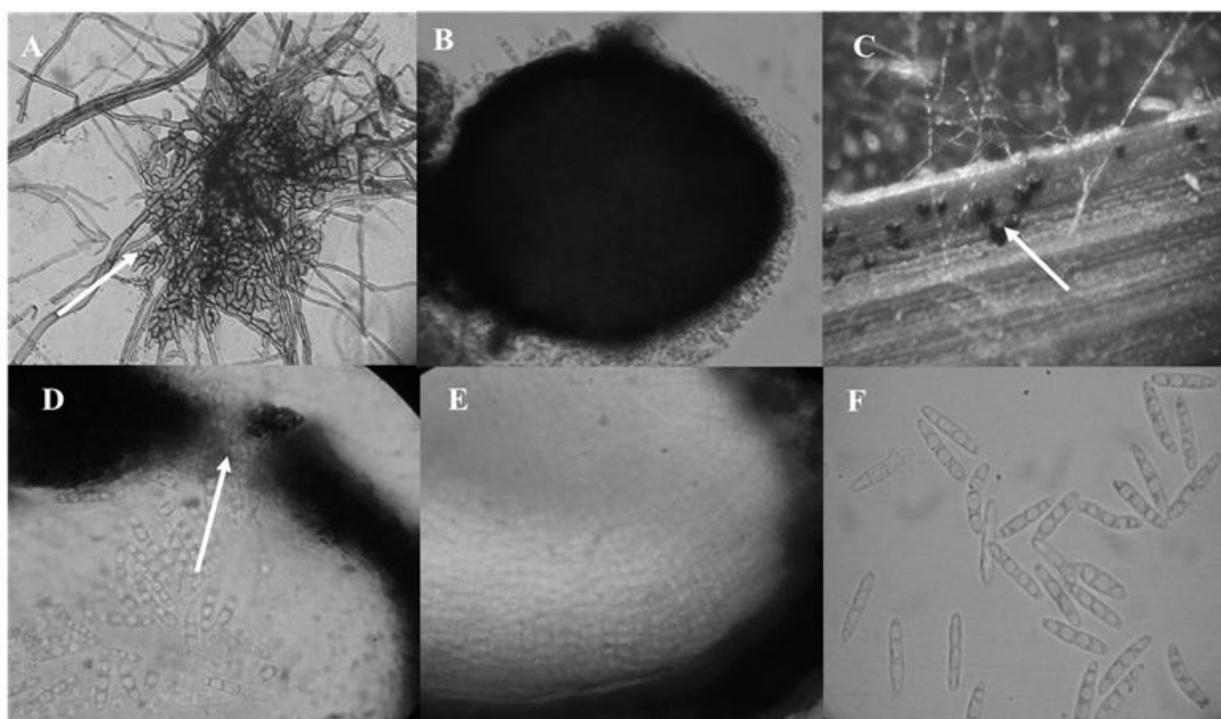


Figura 9. Desarrollo del picnidio. A) Diferenciación de células pseudoparenquimatosas (10x). B) Picnidio maduro (10x). C) Desarrollo del picnidio en la hoja de tulle. D) Ostiolo papilado del picnidio (40x). E) Abundante producción de conidias en arreglo uniseriado. F) Conidios con cuatro septos gatulados.

Las secuencias obtenidas (Figura 10) con los iniciadores universales ITS1F e ITS4R tuvieron una alta homología con secuencias reportadas como *Saccharicola bicolor* y *Saccharicola* sp. (Cuadro 9); sin embargo, con los iniciadores EF1-728F y EF1-986R la secuencia obtenida (número de

accesión en el GenBank: KP757893) no tuvo un porcentaje de homología confiable con secuencias reportadas con estos iniciadores para aislamientos identificados como *Saccharicola*.

Cuadro 9. Porcentaje de identidad de las secuencias obtenidas de DNA extraído de micelio desarrollado a partir de diferentes aislamientos de la cepa TS1, con las reportadas en el GenBank.

Origen del DNA extraído (aislamiento)	Región amplificada	Tamaño del producto obtenido	Número de accesión asignado en GenBank	% de identidad con secuencias reportadas
TS1	ITS1-5.8s-ITS2 rDNA	526 pb	KP751215	97% con <i>Saccharicola bicolor</i> ^z
TS1-ppi	ITS1-5.8s-ITS2 rDNA	526 pb	KP751216	98% con <i>Saccharicola</i> sp. ^y
TS1-rh	ITS1-5.8s-ITS2 rDNA	520 pb	KP751217	98% con <i>Saccharicola bicolor</i> ^x
TS1-ccr	ITS1-5.8s-ITS2 rDNA	517 pb	KP757894	97% con <i>Saccharicola bicolor</i> ^z
TS1-cppi	ITS1-5.8s-ITS2 rDNA	523 pb	KP757895	97% con <i>Saccharicola bicolor</i> ^z

TS1: cepa reactivada del aislamiento original; TS1-ppi: cepa re-aislada en la prueba de patogenicidad; TS1-rh: cepa re-aislada de la prueba de rango de hospedantes; TS1-ccr y TS1-cppi; ambas provenientes de conidios de fructificaciones desarrolladas *in vitro*, en los residuos de hojas de tule de la cepa reactivada y del aislamiento re-aislado de las plantas de la prueba de patogenicidad en invernadero; pb: pares de bases. ^zMorales *et al.*, (1995); ^yRojas *et al.*, (2012); ^xPawlowska *et al.*, (2014); ^wQuaedulieg *et al.*, (2013).

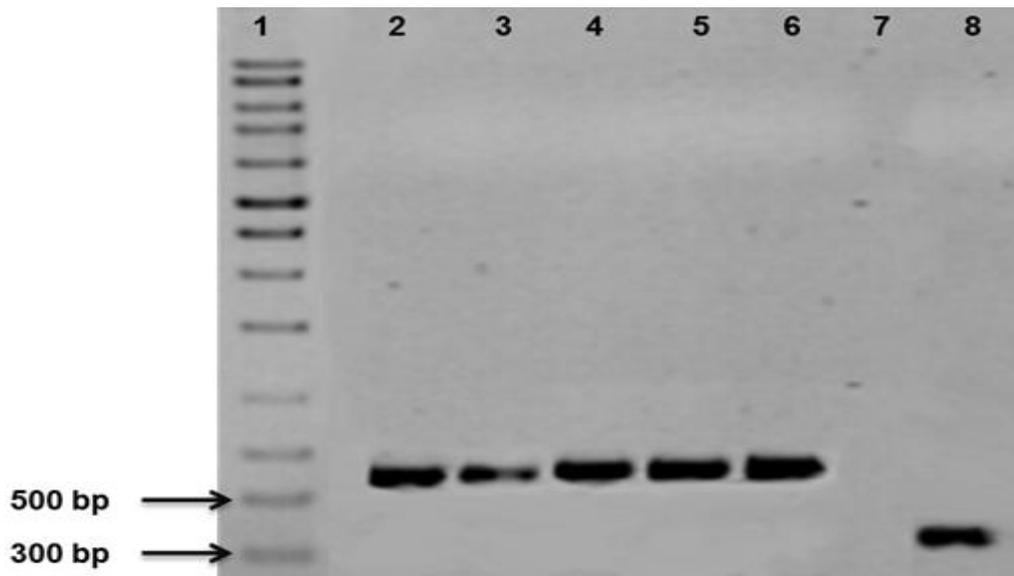


Figura 10. Fragmentos amplificados a partir de DNA del aislamiento TS1. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb axygen®; 2-6) PCR con iniciadores ITS1F e ITS4R, respectivamente; 8) PCR con iniciadores específicos EF-728F y EF-986R de la cepa TS1.

El análisis filogenético realizado, utilizando secuencias obtenidas con los iniciadores ITS1F e ITS4R y reportadas en GenBank (Cuadro 10), confirmó que los cinco aislamientos de TS1 corresponden al mismo individuo, pues mostraron 99% de identidad entre ellas. Estas secuencias a su vez se relacionaron con las de aislamientos reportados como *Saccharicola bicolor* (90% identidad), *Saccharicola* sp. (90% identidad) y *Saccharicola taiwanensis* (79% identidad). Asimismo, las secuencias de TS1 se encuentran alejadas de aislamientos reportados para el género *Leptosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*, *Phaeosphaeria* y *Stagonospora* (Figura 11).

Cuadro 10. Secuencias usadas en el análisis filogenético de la región ITS1-5.8s-ITS2 de la cepa TS1.

Aislamiento	Nombre del aislamiento	Gen Bank número de accesión	Planta hospedante	País de origen	Autor
<i>Saccharicola bicolor</i>	ATCC 42652	U04203	<i>Saccharum officinalis</i>	Kenia	Morales <i>et al.</i> , 1995
<i>Saccharicola</i> sp.	CBMAI 1030	GQ370379	<i>Saccharum officinalis</i>	Brasil	Rojas, 2014 ^z
<i>Saccharicola taiwanensis</i>	ZJ3	KJ572125	<i>Coix lachryma-jobi</i>	China	Min, 2014 ^z
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	CBS 652.86	AF250829	<i>Typha latifolia</i>	Suiza	Câmara <i>et al.</i> , 2001
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	CBS 206.87	KF251190	<i>Zea mays</i>	Holanda	Quaedulieg <i>et al.</i> , 2013
<i>Phaeosphaeria eustoma</i>	CBS 574.86	AF439480	<i>Dactylis glomerata</i>	Estados Unidos	Câmara <i>et al.</i> , 2002
<i>Leptosphaeria typharum</i>	CBS 591.86	AF439465	<i>Typha angustifolia</i>	Suiza	Câmara <i>et al.</i> , 2002
<i>Leptosphaeria weimeri</i>	ATCC 44387	AF439466	<i>Medicago sp</i>	Estados Unidos	Câmara <i>et al.</i> , 2002
<i>Leptosphaeria</i> sp.	PHY-06	JX401979	<i>Phlomis younghusbandii</i>	China	Zhang y Guo, 2012 ^z
<i>Stagonospora</i> sp.	Po41	AY208791	<i>Asociado a semillas de árboles forestales tropicales</i>	Suecia	Gure <i>et al.</i> , 2002 ^z

^zComunicación personal.

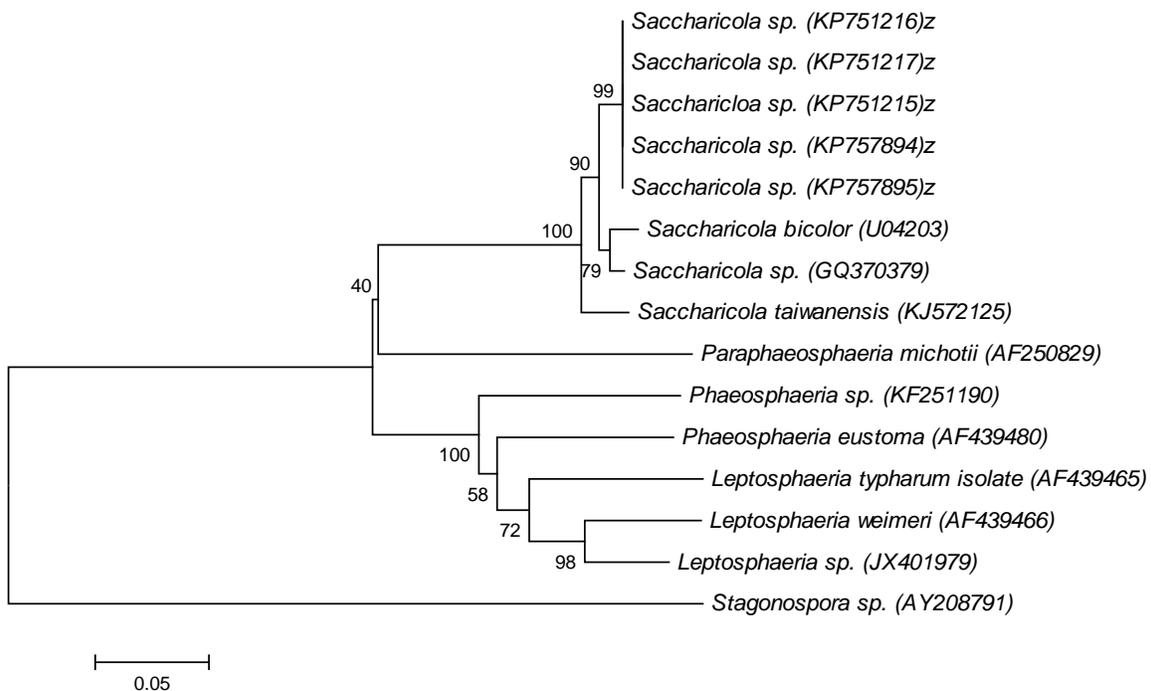


Figura 11. . Análisis filogenético de la región ITS1-5.8s-ITS2 rDNA, que muestra la relación de las secuencias obtenidasz de aislamientos de TS1 con secuencias de los géneros *Saccharicola*, *Paraphaeosphaeria*, *Phaeosphaeria*, *Leptosphaeria* y *Stagonospora* reportadas en el GenBank utilizando el método Neighbour-Joining con un re-muestreo de 5000 réplicas

V. DISCUSIÓN

Las cepas patogénicas al tule fueron *A. alternata* 2.5, *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *P. glomerata*, *P. expansum* y TS1 (Cuadro 6) (Figura 4); con excepción de *A. alternata* y *Cladosporium* sp (Pugh y Mulder, 1971), las demás no han sido previamente consignadas como patógenos del tule, ni como acb; y la especie *A. alternata* se reporta como acb pero del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) (Mohan *et al.*, 2002, 2003). *P. expansum*, *Mucor* sp., y *P. glomerata*, fueron menos virulentos que *A. alternata* 2.5 y TS1; y de estas dos cepas *A. alternata* 2.5 fue menos agresiva que TS1, debido a que tuvieron que pasar entre 12 y 14 días posteriores a la inoculación para observar una necrosis extensiva de la hoja. En cambio, la cepa TS1 requirió de 8 días para provocar dicho síntoma (Figura 4 y 5) (Cuadro 6). TS1 presentó los porcentajes más altos de incidencia en cada repetición del ensayo *in vitro* (Cuadro 6). Los resultados obtenidos indican que TS1 tiene una alta virulencia y agresividad sobre tule (Figura 5 y 6), características deseables en acb potenciales (Charudattan, 2001b; Barreto *et al.*, 2000; Charudattan y Dinoor, 2000; Kadir y Charudattan, 2000; Martínez y Charudattan, 1998; Espadas y Zita, 1992). La virulencia y la agresividad de TS1 es comparable a la reportada para *Colletotrichum* sp., (Espadas y Zita, 1992).

Con la inoculación de TS1 en plantas adultas de tule en condiciones de invernadero, se pudo comprobar su patogenicidad previamente mostrada en los ensayos *in vitro*, aunque tomó mayor tiempo (1-4 meses) la aparición de síntomas y muerte de tejidos (Figura 6) (Cuadro 7). No obstante, se reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad y se reisoló al hongo. El retraso pudo deberse al hecho de que las condiciones de humedad y temperatura en el invernadero no fueron tan favorables, como aquellas más constantes que prevalecieron durante los ensayos *in vitro* (60% de humedad relativa y 27°C). En las plantas inoculadas ocurrió la muerte sólo de hojas y tallos pero

no de rizomas, los cuales desarrollaron nuevos brotes en comparación con las plantas testigo, posiblemente como una respuesta de defensa de la planta al ataque por el patógeno (Figura 6). Un fenómeno similar se reporta en plantas de cítricos atacadas por CTV, las cuales antes de morir producen muchos frutos de pobre calidad (Loeza, 2008); lo mismo sucede en árboles de aguacate infectadas por *Phytophthora cinnamomi* (Echemendia, 2002). Esta respuesta del rizoma estaría limitando el impacto del antagonista en la propagación vegetativa de esta maleza, sin embargo, habrá que determinar qué tan vigorosos y viables son dichos brotes.

Dado que solamente se realizó una aplicación de TS1, es importante determinar si con inoculaciones repetidas se logra incrementar la severidad de la enfermedad e impedir la formación de nuevos brotes en el rizoma. El potencial real del antagonista TS1 como acb del tule tendrá que determinarse mediante ensayos en parcelas experimentales.

De los 46 cultivares inoculados con TS1, siete presentaron alguna reacción: cuatro fueron altamente susceptibles (espinaca, cilantro, chícharo y col de bruselas), dos medianamente susceptibles (melón y sandía), y una resistente (alcachofa), las restantes 39 fueron inmunes (Cuadro 8) (Figura 7). En plantas susceptibles se observó una marcada disminución del crecimiento respecto al testigo, con excepción de las plantas de espinaca que murieron. En las plantas medianamente susceptibles se desarrolló micelio sobre las hojas pero la planta se mantuvo viva. En alcachofa la presencia de pequeñas lesiones cloróticas y ocasionalmente necróticas, de las cuales no se logró aislar al patógeno, se consideró que tales lesiones fueron una respuesta hipersensitiva al patógeno, este tipo de reacción consiste en una muerte celular programada que tiene por objetivo restringir el avance del patógeno; también es considerada como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por un patógeno (Sanzón y Zavaleta, 2011). Los resultados obtenidos sugieren que TS1

puede tener un rango de hospedantes limitado y que por lo tanto podría utilizarse para el manejo del tule en aquellas áreas donde se cultiven las hortalizas y gramíneas que no fueron hospedantes del hongo.

Los picnidios producidos por TS1 son tipo *Stagonospora* (Figura 8 y 9), coincidiendo con lo reportado por Eriksson y Hawksworth (2003) y aunque no fue posible observar estructuras de reproducción sexual (Pseudotecios), el análisis molecular de la región ITS1-5.8s-ITS2 indicó que TS1 corresponde al género *Saccharicola* (Figura 11) Este ascomiceto fue descrito por Eriksson y Hawksworth en 2003 y solamente se han reportado dos especies, *S. bicolor* y *S. taiwanensis*, las cuales difieren en la forma y el tamaño de la ascospora. Las características culturales de cepas puras obtenidas a partir de conidios producidos por los picnidios, fueron similares a las observadas para TS1, comprobándose así que el hongo que produjo los picnidios tipo *Stagonospora* corresponde al anamorfo de *Saccharicola*.

El alto porcentaje de identidad que mostraron las secuencias de los diferentes aislamientos de TS1, con las secuencias reportadas en el GenBank para *Saccharicola*, revelan que la cepa TS1 corresponde al género *Saccharicola* (Cuadro 9). Cabe destacar, que solo se apreció la formación de picnidios cuando el hongo se sembró sobre hojas esterilizadas de tule; lo cual podría ser un indicativo de una alta especificidad, cualidad ampliamente deseable en un acb de maleza (Charudattan, 2001a, 2001b). La posibilidad de que la cepa TS1 corresponda a *Saccharicola bicolor* es alta, debido al elevado porcentaje de identidad que los diferentes aislamientos de la cepa TS1 presentaron con dicha especie (Cuadro 9). La confirmación de que TS1 realmente corresponde a *S. bicolor*, se tendrá cuando se logre corroborar que nuestro aislamiento produzca pseudotecios.

Recientemente se reportó a un aislamiento de *Saccharicola* sp. como endófito de caña de azúcar (*Saccharum officinalis*) y con la capacidad de producir metabolitos secundarios conocidos como poliquétidos (Rojas *et al.*, 2012). Estos compuestos tienen un alto potencial de aplicación en la industria, medicina (humana y animal) y muy posiblemente en la agricultura contra fitopatógenos (Rojas *et al.*, 2012). Chapla *et al.* (2012) y Honório *et al.* (2013) aislaron a un endófito identificado como *Saccharicola* sp. en *Eugenia jambolana*, que produce una amplia gama de metabolitos bioactivos capaces de inhibir a *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium* sp., *Microbotryum violaceum*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* y *Chlorella fusca*. Posiblemente la capacidad de *Saccharicola* sp. de inducir enfermedad en tule se deba en parte a la producción de estos compuestos; por lo tanto, es necesario investigar si la cepa TS1 aislada de tule e identificada como *Saccharicola* sp., produce dichos metabolitos, y de ser el caso, llevar a cabo su caracterización química.

VI. CONCLUSIONES

Las cepas TS1, *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *P. glomerata*, *P. expansum* y *A. alternata* 2.5 fueron patogénicas al tule; de ellas, TS1, fue la más virulenta y agresiva. TS1, fue patogénico solamente en seis hortalizas de 46 cultivares inoculados. Mediante análisis morfológico y molecular de la región ITS1-5.8s-ITS2 se concluyó que la cepa TS1 corresponde a *Saccharicola* sp. siendo este el primer reporte de *Saccharicola* sp. como agente de control biológico del tule (*Typha domingensis* Pers.).

VII. LITERATURA CITADA

Aguilar, Z.J.A., M, Camarena, O., T, Center, D., B, Bojórquez, G. 2003. Biological control of waterhyacinth in Sinaloa, Mexico with the wevils *Neochetina bruchi* and *N. eichhorniae*. *BioControl* 48, 595-608.

Barreto, R., Charudattan, R., Pomella, A., Hanada, R. 2000. Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Protection* 19, 697-703.

Becker, E., Shamoun, S. F., Hintz, W. E. 2005. Efficacy and environmental fate of *Chondrostereum purpureum* used as a biological control for red alder (*Alnus rubra*). *Biological Control* 33, 269-277.

Bewick, T. A., Binning, L. K., Stevenson, W. R., Stewart, J. 1987. A mycoherbicide for control of swamp dodder (*Cuscuta gronovii* Willd.) Cuscutaceae. In: Anon. Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants. Germany, pp. 93-104.

Bojórquez, B. G. 1999. Evaluación del impacto provocado por los agentes de control biológico sobre especies de malezas acuáticas que afectan canales y drenes de los distritos de riego 010 y 074. Anexo 7 del convenio IMTA-UAS Culiacán, Sinaloa. pp 100.

Bojórquez, B. G. 2009. Efecto de la aplicación de hongos en el rebrote de Tule (*Typha domingensis* Pers.) En drenes de Sinaloa. Memoria del XXX Congreso de la ASOMECIMA pp. 2.

Bonilla, B. J. R., Santamaría, B. 2013., Plantas acuáticas exóticas y trasladadas invasoras, en: Mendoza, R., Koleff, P. (eds.), Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 223-247.

Câmara, P. S. M., Palm, E. M., van Berkum, P., O'Neill, R. N. 2002. Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. *Mycologia* 94, 630-640.

Câmara, P. S. M., Palm, E. M., van Berkum, P., Stewart, L. E. 2001. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a molecular and morphological approach. *Mycological Research* 1, 41-56.

Camarena, M. O., Aguilar, J. A. Z. 2012., EL IMTA y el control biológico de maleza acuática en distritos de riego del país (experiencias desde 1990). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, pp. 63.

Carbone, I., Kohn, M. L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553-556.

Chapla, M. V., Somensi, A., Cavalheiro, J. A., Bolzani, S. V., Araujo, R. A. 2012. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. 35a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Brasil, pp 1.

Charudattan, R., 1996. Biological control of weeds. An international overview. In: V. SICONBIOL (Simposio de Controle Biologico), Foz do Iguacu, Brazil, June 9–14, pp. 270–282.

Charudattan, R., 2001a. Are we on top of aquatic weeds? Weed problems, control options, and Challenges In: Riches, C.R. (eds.), BCPC Symp. Proc. No. 77: The World's Worst Weeds. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, U. K., pp. 48 – 68.

Charudattan, R., 2001b. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *Biocontrol* 46, 229–260.

Charudattan, R., 2001c. Biological Control of Water Hyacinth by Using Pathogens: Opportunities, Challenges, and Recent Developments. In: Julien, M. H., Hill, M. P., Center, T. D., Ding Jianqing (eds.), *Biological and Integrated Control of Water Hyacinth, Eichhornia crassipes*. Enter and Ding Jianqing AICAR. Australia, pp. 21-28.

Charudattan, R., 2005. Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target? *Biological Control* 35, 183-196.

Charudattan, R., Dinooor, A. 2000. Biological control of weeds using plant pathogenes: accomplishments and limitations. *Crop protection* 19, 691-695.

Cock M. J, W. 1996. Capítulo 9. Control biológico de malezas. *FAO Plant Production and Protection Papers* pp 11.

Corns, W. G., Gupta, G. R., 1971. Chemical control of cattail, *Typha latifolia*. *Canadian Journal Plant Science* 51, 491-497.

de Jong, M. D. 2000. The BioChon story: deployment of *Chondrostereum purpureum* to suppress stump sprouting in hardwoods. *Mycologist* 14, 58-62.

Echemendia, M. Y. 2002. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura (FAO). pp. 30.

Eriksson, O. E., Hawksworth, D. L. 2003. *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. *Mycologia* 95 426-433.

Espadas, R. M., Zita, P. G., 1992. *Colletotrichum* sp. Limitante natural de la maleza acuática *Typha latifolia*. XV Congreso Nacional de Control Biológico, México, pp. 198-202.

Ferrell, J., Charudattan, R., Elliot, M., Hiebert, E. 2008. Effects of Selected Herbicides on the Efficacy of *Tobacco mild green mosaic virus* to Control Tropical Soda Apple (*Solanum Viarum*). *Weed Science* 56(1):128-132.

Gutiérrez, L. E., Arreguín, C. F., Huerto, D. R., Saldaña, F. P. 1994. Control de malezas acuáticas en México. *Ingeniería hidráulica en México*. 9, 15-34.

Heap, I. 2006. The international survey of herbicide resistant weeds [online]. Website <http://www.weedscience.com/> [consultado el 29 Abril 2014].

Hernández, C. E., Villanueva, J. R., Mosqueda, V. R., Mora, A. J. A. 2004. Efecto de la erradicación de plantas enfermas por el PRSV-P en un sistema de manejo integrado del papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. Revista mexicana de fitopatología 22, 282-388.

Honório, E. A., Gubiani, R. J., Chapla, M. V., Bolzani, da S. V., Cavaleiro, J. A., Araújo, R. A. 2013. *Saccharicola* sp. um endófito de *Eugenia jambolana*, um prolífico produtor de metabólitos bioativos. 36a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Brasil, pp. 1.

Hopen, H.J., Caruso, F.L., Bewick, T.A. 1997. Control of dodder in cranberry, *Vaccinium macrocarpon*, with a pathogen-based bioherbicide. In: Anon. Proceedings of the Sixth International Symposium on *Vaccinium* culture. USA, pp.427-428.

Julien M, H. y Griffiths M, W., 1998. Biological Control of Weeds: A World Catalogue of Agents and their Target Weeds, fourth ed. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Julien, M., White, G., 1997. Biological control of weeds: Theory and practical application. ACIAR Monograph, Australian.

Kadir, J., Charudattan, R. 2000. *Dactylaria higginsii*, a fungal bioherbicide agent for purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). Biological control 17, 113-124.

Kaiser, W. J., Ndimande, B. N., Hawksworth, D. L. 1979. Leaf-scorch disease of sugarcane in Kenya caused by a new species of *Leptosphaeria*. Mycologia 71, 479-492.

Kowalik, M. y Krasny, M. 2009. Fungi occurring on garden pond plants. *Phytopathologia* 51, 21–26.

Kwan, D. H., Schulz, F. 2011. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16, 6092-6115.

Loeza, K. E. 2008. Transmisibilidad de aislamientos del citrus tristeza virus (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados con genes del CTV. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo. pp. 103.

Martínez, J. M., 2014. Control biológico de plantas acuáticas exóticas invasoras, en: Mendoza, R., Koleff, P. (eds.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 249-255.

Martinez, J. M., Gutierrez, L. E. 2001. Host ranges of *Cercospora piaropi* and *Acremonium zonatum*, microbial herbicides candidates for waterhyacinth. *Phytoparasitica* 29, 175-177.

Martínez, J.M., Charudattan, R. 1998. Survey and evaluation of mexican native fungi for potential biocontrol of water hyacinth. *J. Aquatic Plant Management* 36, 145-148.

Mazurkiewicz-Zapałowicz, K., Wrobel, M., Silicki, A., Wolska, M. 2006. Studies on phytopathogenic and saprotrophic fungi in rush associations of Lake Glinno (NW Poland). *Acta Mycologica* 41, 125-138.

Mohan, B. R., Sajeena, A., Seetharaman, K. 2003. Bioassay of the potentiality of *Alternaria alternata* (Fr.) keissler as a bioherbicide to control waterhyacinth and other aquatic weeds. Crop protection 22, 1005-1013.

Mohan, B. R., Sajeena, A., Seetharaman, K., Vidhyasekaran, P., Rangasamy, P., Som Prakash M., Senthil, A.R., Biji K. R. 2002. Host range of *Alternaria alternata*—a potential fungal biocontrol agents for waterhyacinth in India. Crop Protection 21, 1083-1085.

Morales, V. M., Jasalavich, C. A., Pelcher, L. E., Petrie, A. G., Taylor, J. L. 1995. Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. Mycological Research 99, 593-604.

Müller, E., Nentwig, W. 2011. Plant pathogens as biocontrol agents of *Cirsium arvense* – an overestimated approach?. NeoBiota 11: 1-24.

Nyvall, F. R., Hu, A. 1997. Laboratory Evaluation of Indigenous North American Fungi for Biological Control of Purple Loosestrife. Biological Control 8, 37-42.

Ou, X., Watson, A.K., 1993. Mass culture of *Subanguina picridis* and its bioherbicidal efficacy on *Acroptilon repens*. J. Nematol 25, 89–94.

Pawlowska, J., Wilk, M., Sliwinska-Wyrzychowska, A., Metrak, M., Wrzosek, M. 2014. The diversity of endophytic fungi in the above-ground tissue of two *Lycopodium* species in Poland. Symbiosis 63, 87-97.

Pomella, V. A. W., Barreto, W. R., Charudattan, R. 2007. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides* *BioControl* 57, 271-288.

Ponnappa, K. M. 1968. Some interesting fungi III. On *Typha*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B* 68, 175-180.

Pugh G, J. F., Mulder J, L. 1971. Mycoflora associated with *Typha latifolia*. *Transactions of British Mycological Society* 57, 273-282.

Quaedvlieg, W., Verkley, G. J., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfenas, A. C., Swart, W. J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2013. *Sizing up Septoria*. *Studies in Mycology* 75, 307-390.

Rojas, J. D., Durães, S. L., de Araujo, W. L., Garcez, L. M. S., Ferreira, da S. L., Furlan, R. A. R., Padilla, G. 2012. The diversity of poliketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. *Microbial Ecology* 63, 565-577.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.

Sanzón, G. D., Zavaleta, M. E. 2011. Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología* 29, 154-164.

SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N. C.

Shabana, M. Y., Cuda, P. J., Charudattan, R. 2003. Combining plant pathogenic fungi and the leaf-mining fly, *Hydrellia pakistanae*, increases damage to hydrilla. *Journal Aquat Plant Manage* 41, 76-81.

Shoemaker, R. A., Babcock, C. E. 1988. *Phaeosphaeria*. *Canadian journal of botany* 67, 101.

Silva, V. M., Bojórquez, B. G., Zita, P. G. A., Corrales, A. L. J., Hernández, V. J. A., Espadas, R. M. 2011. Hongos asociados a *Typha domingensis* tule en canales de riego en tres regiones de México. Memoria XXXII Congreso ASOMECEMA en Toluca, Edo. México. 45-46 p.

Skroch, P., Nienhuis, J. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical Applied Genetics* 91, 1078-1085.

Smith, S. G. 1967. Experimental and natural hybrids in North American *Typha* (Typhaceae). *American Midland Naturalist* 78, 257-287.

Smith, S. G. 1987. *Typha*: Its taxonomy and the ecological significance of hybrids. *Archiv für Hydrobiologie, Beih. Ergebn. Limnol* 27, 129-138.

Smith, S. G. 2000. Typhaceae. In: Flora of North America (eds.), by Flora of North America Editorial Committee. Oxford University Press. USA, pp 278-285.

Smith, S. M., Newman, S. 2001. Growth of southern cattail (*Typha domingensis* Pers.) seedlings in response to fire-related soil transformations in the Northern Florida Everglades. *Wetlands* 21, 363-369.

Spencer, R.N., Coulson, R.J. 1976. The biological control of Alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*, in the United States of America. *Aquatic Botany* 2, 177-190.

Watson, A. K. (1986a). Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian knapweed. *Journal of Nematology* 18, 149-154.

Watson, A. K. (1986b). Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. *Journal of Nematology* 18, 112-120.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. New York, pp. 315–322.

Winston, R., Randall, B. C., De Clerck-Floate, R., McClay, A., Andreas, J., Schwarzländer, M. 2014. Field guide for the biological control of weeds in the northwest. US Department of Agriculture pp. 333.