

## Biocontrol *in vitro* de *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter (uredinales: puccinaceae) con hongos antagonistas\*

### Biocontrol *in vitro* *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter (uredinales: puccinaceae) with antagonistic fungi

Edith Sonia Romero-Orán<sup>1</sup>, Jesús Gaudencio Aquino-Martínez<sup>2</sup>, José Francisco Ramírez-Dávila<sup>3§</sup> y Ana Tarín Gutiérrez-Ibáñez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México-Campus Universitario "El Cerrillo" A. P. Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km 15, C. P. 50200. Tel: (722) 296-55-18. (esoriar1989@hotmail.com). <sup>2</sup>Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). Conjunto Sedagro s/n, Metepec, Estado de México, C. P. 52140. Tel: (722) 2322646. (jaquinom@icamex.gob.mx). <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. (atgutierrez@uaemex.mx). <sup>§</sup>Autor de correspondencia: jframirez@uaemex.mx.

## Resumen

La roya [*Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter], es una enfermedad que afecta el rendimiento y calidad de la flor del gladiolo en el Estado de México y se combate con fungicidas sintéticos. Por ello, se evaluó la eficiencia del biocontrol *in vitro* de *U. transversalis* con hongos antagonistas, además se monitorearon plantaciones de la zona florícola de la entidad, para determinar la severidad de la enfermedad. La actividad antagónica evaluada en condiciones de laboratorio, se realizó en cortes de hojas de gladiolo con pústulas de roya, procedentes de cinco municipios (Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán e Ixtlahuaca), cortes a los que se les asperjó dos concentraciones de conidios (600 y 300 mL de UFC) de seis cepas de hongos; *Cladosporium* sp. (ClGl), *Alternaria* sp. (AltGl), *Aspergillus* sp. (AspGl) y *Trichoderma* sp. (TrZA, TrJi y TrPi), con tres repeticiones, bajo un diseño experimental completamente al azar. Los aislamientos TrPi (608.0X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC), TrZA (371.2X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC) y AltGl (470.4X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC), presentaron diferencias significativas con mayor colonización de pústulas. El modo de acción de las cepas antagonistas fue por hiperparasitismo ocasionando hinchamiento, degradación y deformación de

## Abstract

The rust [*Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter], is a disease that affects the yield and quality of gladiolus flower in the State of Mexico and fought with synthetic fungicides. Therefore, biocontrol efficacy was evaluated *in vitro* of *U. transversalis* with antagonistic fungi, also plantations floricultural area monitored entity, to determine the severity of the disease. The antagonistic activity evaluated in laboratory conditions was performed on leaf sections of gladiolus with rust pustules from five municipalities (Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán and Ixtlahuaca), cuts that were sprinkles two concentrations of conidia (600 and 300 mL of UFC) six strains of fungi; *Cladosporium* sp. (ClGl), *Alternaria* sp. (AltGl), *Aspergillus* sp. (AspGl) and *Trichoderma* sp. (TrZA, TrJi and TrPi), with three replications, under a completely randomized experimental design. The isolates TrPi (608.0X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC), TrZA (371.2X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC) and AltGl (470.4X10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> UFC), showed significant differences with greater colonization of pustules. The mode of action of antagonistic strains was by hyperparasitism causing swelling, degradation and deformation of uredinia and urediospores. The municipality highest percentage of infection was 88.3% Malinalco

\* Recibido: junio de 2016  
Aceptado: agosto de 2016

uredias y urediosporas. El municipio de mayor porcentaje de infección fue Malinalco con 88.3%, y se reporta oficialmente a Ixtlahuaca y Jocotitlán como municipios infectados por roya transversal. Los mejores aislamientos serán evaluados en campo e invernadero, para poder implementarse en un programa de manejo integrado de roya transversal del gladiolo y fomentar el biocontrol de patógenos.

**Palabras clave:** *Uromyces transversalis*, enfermedad, parasitismo, severidad.

## Introducción

La floricultura es una industria global en los países en vías de desarrollo y desarrollados; el volumen del comercio mundial se estima en un valor de más de 100 billones de dólares por año (African Business Magazine, 2012). En México, la floricultura es una actividad de importancia económica, existiendo en el país alrededor de 2.2 mil hectáreas cultivadas de gladiolo (Escalante *et al.*, 2006). Dicho cultivo es afectado por diferentes tipos de plagas y enfermedades, entre las principales enfermedades fúngicas, destaca la roya transversal, originada por el agente causal *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, misma que fue reportada oficialmente en México, en noviembre de 2004 (CESAVEM, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

En el Estado de México se siembran alrededor de 800 ha; sin embargo, el rendimiento y calidad de la flor son afectados por enfermedades como la "roya transversal" ocasionando pérdidas mayores a 90% de la producción (CESAVEM, 2005; Schubert *et al.*, 2006). Para el manejo y control de esta enfermedad, en el Estado de México, se han aplicado diversas estrategias basadas principalmente en el uso de fungicidas químicos sintéticos, favoreciendo la aparición de hongos fitopatógenos resistentes, por lo que se requieren nuevos productos para el manejo de enfermedades (Vásquez *et al.*, 2013).

La SAGARPA (2005); CESAVEM (2005); CESVMOR (2006), recomiendan el uso de fungicidas como Azoxystrobin<sup>®</sup>, Trifloxystrobin + Oxycarboxin<sup>®</sup>, Amistar<sup>®</sup> 50 y Epoxiconazol<sup>®</sup>, para controlar la enfermedad a partir de la detección del primer síntoma (pústula), teniendo mayor efectividad la aplicación el Oxycarboxin + Tebuconazole. En las últimas décadas, se han incrementado estudios dirigidos a implementar métodos biológicos con efecto potencial en el control de enfermedades, debido a la reciente tendencia

with, and officially reported to Ixtlahuaca and Jocotitlan as cross rust infected municipalities. The best isolates will be evaluated in field and greenhouse, to be implemented in an integrated management program cross gladiolus rust and promote biocontrol of pathogens.

**Keywords:** *Uromyces transversalis*, disease, parasitism, severity.

## Introduction

The floriculture is a global industry in developing countries and developed countries; the volume of world trade is estimated at a value of more than \$100 billion per year (African Business Magazine, 2012). In Mexico, floriculture is an activity of economic importance, existing in the country about 2.2 thousand hectares planted gladiolus (Escalante *et al.*, 2006). The crop is affected by different types of pests and diseases, the main fungal diseases, stresses the cross rust, caused by the causative agent *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, same that was officially reported in Mexico in November 2004 (CESAVEM, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

In the State of Mexico around 800 ha are planted; however, yield and flower quality are affected by diseases such as "cross rust" causing major losses to 90% of production (CESAVEM, 2005; Schubert *et al.*, 2006). For the management and control of this disease in the State of Mexico, have implemented various strategies based primarily on the use of synthetic chemical fungicides, favoring the emergence of resistant fungal pathogens, so new products for disease management are required (Vásquez *et al.*, 2013).

The SAGARPA (2005); CESAVEM (2005); CESVMOR (2006), recommend the use of fungicides as Azoxystrobin<sup>®</sup>, Trifloxystrobin + Oxycarboxin<sup>®</sup>, Amistar<sup>®</sup> 50 and Epoxiconazol<sup>®</sup>, to control the disease from first symptom detection (pustule), taking the more effective the application Oxycarboxin + Tebuconazole. In recent decades, they have increased biological studies aimed at implementing methods with potential effect on disease control, due to the recent tendency to use less harmful to the environment alternatives (Flores *et al.*, 2013). An innovative strategy for managing pests and diseases of plants of agricultural importance, is the biological control by antagonistic microorganisms to the pathogen (Whipps, 2001; Harman, 2006).

a utilizar alternativas menos perjudiciales al ambiente (Flores *et al.*, 2013). Una estrategia innovadora para el manejo de plagas y enfermedades de plantas de importancia agrícola, es el control biológico, mediante microorganismos antagonistas al patógeno (Whipps, 2001; Harman, 2006).

Dentro del control biológico existe el empleo de enemigos naturales (introducidos o manipulados), cuyo conocimiento de su efectividad y de su mecanismo de acción es esencial para el manejo y el desarrollo de estrategias en la implementación de una agricultura sostenible (Torres *et al.*, 2008). El uso de hongos antagonistas nativos adaptados a las condiciones de manejo del cultivo, puede dar mejores resultados en la reducción del ataque del patógeno, pero es necesario evaluarlos antes de su recomendación. Debido a lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo experimentar y evaluar la eficiencia antagonista en condiciones *in vitro*, de seis cepas de los hongos *Cladosporium* sp. (ClGI), *Alternaria* sp. (AltGI), *Aspergillus* sp. (AspGI) y *Trichoderma* sp. (TrZA, TrJi y TrPi), contra la roya transversal (*Uromyces transversalis*), así como evaluar el porcentaje de infección en cinco municipios (Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán e Ixtlahuaca) de la zona florícola del Estado de México, para establecer si la utilización de micoparásitos como controladores de enfermedades, constituye una alternativa eficaz para la sustitución del control químico sintético.

## Materiales y métodos

**Muestreo.** En el periodo de julio a diciembre de 2013 se realizaron 15 muestreos de plantaciones comerciales de gladiolo con roya (*Uromyces transversalis*), distribuidos en cinco municipios que conforman parte de la zona florícola del Estado de México; Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán e Ixtlahuaca. El muestreo del cultivo llevo a cabo durante las etapas de floración, cosecha y postcosecha. De cada muestreo se colectaron 15 hojas al azar.

**Evaluación de severidad.** Se eligieron 12 hojas de plantas al azar de cada parcela muestreada, determinando la severidad de la enfermedad mediante una escala a nivel foliar adaptada de Núñez y Romero (1980) (Cuadro 1).

**Aislamiento e identificación de hongos antagonistas.** De hojas infectadas por *U. transversalis* en gladiolo, *Puccinia horiana* en crisantemo, *Phragmidium mucronatum* en rosa, y de hojas de clavel y de chile manzano infectadas

Within the biological control there the use of natural enemies (introduced or manipulated), whose knowledge of its effectiveness and its mechanism of action is essential for the management and development of strategies for the implementation of sustainable agriculture (Torres *et al.*, 2008). The use of native antagonistic fungi adapted to the conditions of crop management, can give better results in reducing pathogen attack, but it is necessary to evaluate them before their recommendation. Because of this, the present study aimed to test and evaluate the efficiency antagonistic *in vitro* conditions, six strains of the fungus *Cladosporium* sp. (ClGI), *Alternaria* sp. (AltGI), *Aspergillus* sp. (AspGI) and *Trichoderma* sp. (TrZA, TrJi and TrPi) against the cross rust (*Uromyces transversalis*), as well as evaluating the rate of infection in five municipalities (Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán and Ixtlahuaca) of the floriculture area of the State of Mexico, to establish if the use of mycoparasites as drivers disease, is an effective replacement for synthetic chemical control alternative.

## Materials and methods

**Sampling.** In the period from July to December 2013 were made 15 samples of commercial plantations with gladiolus rust (*Uromyces transversalis*), distributed in five municipalities that make up part of the floriculture area of the State of Mexico; Villa Guerrero, Zumpahuacán, Malinalco, Jocotitlán and Ixtlahuaca. The crop sampling took place during the stages of flowering, harvest and postharvest. The 15 sheets of each sample were collected randomly.

**Assessment of severity.** The 12 sheets of plants at random for each sample plot were chosen, determining the severity of the disease by a scale adapted to foliar level Núñez and Romero (1980) (Table 1).

**Isolation and identification of antagonistic fungi.** Of infected leaves by *U. transversalis* on gladiolus, *Puccinia horiana* on chrysanthemum, *Phragmidium mucronatum* in rose, and leaves of carnation and chili infected apple with *Cladosporium* sp., were identified under stereomicroscope antagonistic fungi placed on the phytopathogenic fungi of each crop, using taxonomic keys to imperfect fungi (Barnett and Hunter, 1972) and were grown in culture medium potato-dextrose agar (PDA brand Bioxon) acidified with 25% lactic acid (pH 5.5); isolates were incubated between 5-7 days at 26 °C ± 2 °C for sporulation of fungi. Because of its easy and fast growth, and

con *Cladosporium* sp, se identificaron bajo microscopio estereoscópico hongos antagonistas colocados sobre los hongos fitopatógenos de cada cultivo, empleando claves taxonómicas para hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1972) y fueron sembrados en medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA marca Bioxon) acidificado con ácido láctico 25% (pH de 5.5); los aislamientos se incubaron entre 5 -7 días a  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la esporulación de los hongos. Debido a su fácil y rápido crecimiento, además de sus características de micoparasitar a otros hongos (Quiroz *et al.*, 2008), se emplearon tres cepas de *Trichoderma* sp, aisladas de jitomate (TrJi), pino (TrPi) y otra de zacate con avena (TrZA).

Se tomó un disco de crecimiento de 5 mm de cada colonia con un sacabocado estéril y se transfirieron a cajas de Petri con PDA para obtener cultivos uniformes. Las cepas de los hongos antagonistas fueron preparadas bajo dos diluciones a partir de una caja de Petri colonizada, la cual se licuo y aforo en agua destilada a 600 y 300 mL. El licuado obtenido fue vertido en garrafas de plástico con capacidad de 750 mL, a las que se les agregó Aceite micro-refinado de aceite de soya (EPA) y surfactante penetrante en solución acuosa (Inex-A). Asimismo, se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) de cada preparación, cuantificadas mediante Cámara de Neubauer.

Pruebas de antagonismo *in vitro*. Siguiendo la metodología modificada de Hsiang *et al.* (2004), se realizaron cortes transversales con navaja de afeitar en el microscopio estereoscópico de hojas de gladiolo con pústulas de *U. transversalis* de 3X7 cm aproximadamente. Cada corte se depositó sobre una base plástica desinfectada con hipoclorito de sodio (NaClO). Se colocó en cada corte empleando una micropipeta 0.7  $\mu\text{L}$  de la suspensión de UFC de cada antagonista sobre cada una de las pústulas, contando previamente el número total de estas. Una vez vertida la gota de UFC, se pasaron los cortes del tejido junto con las bases plásticas en cajas de Petri con medio agar-agua acidificado con ácido láctico 25%, incubados por 5 días bajo cámara de germinación a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La colonización de los antagonistas se observó cada 24 h, bajo estereomicroscopio.

Porcentaje de colonización. La evaluación final fue considerada a los 5 días, cuando el patógeno cubrió totalmente la pústula y el tejido del cultivo mantuviera turgencia, empleando la fórmula: (%) colonización= (núm. de pústulas colonizadas/ núm. de pústulas totales) X 100, adaptada de la fórmula de Phillips y Hayman (1970).

its characteristics mycoparasite other fungi (Quiroz *et al.*, 2008), three strains of *Trichoderma* sp, isolated from tomato (TrJi), pine (TrPi) and a grass were employed oats (TrZA).

#### Cuadro 1. Escala de severidad para la evaluación del nivel de daño de *Uromyces transversalis* en hojas de gladiolo.

Table 1. Severity scale for assessing the level of damage *Uromyces transversalis* on gladiolus leaves.

Índice	Descripción del daño
0	Hoja sana sin infección
1	1 a 10% de la superficie de la hoja con pústulas
2	11 a 20% de la superficie de la hoja con pústulas
3	21 a 50 % de la superficie de la hoja con pústulas
4	51 a 75% de la superficie de la hoja con pústulas
5	76 a 100% de la superficie de la hoja con pústulas

Nivel de daño. Se calculó empleando la fórmula:  $P = [\Sigma (n * v) / \text{cat. mayor} * N] * 100$ , de Towsand y Heuberger (T y H); donde:  $p$  = % de infección;  $\Sigma$  = sumatoria;  $n$  = número de plantas por categoría;  $v$  = valor numérico de cada categoría;  $\text{cat. mayor}$  = categoría mayor;  $N$  = número de plantas por muestra.

A record growth of 5 mm from each colony was taken with a sterile punch and transferred to Petri dishes with PDA to obtain uniform crops. Strains of antagonistic fungi were prepared under two dilutions from a petri dish colonized, which liquefied and capacity in distilled water at 600 and 300 mL. The obtained liquid was poured into plastic bottles with a capacity of 750 mL, to which were added oil micro-refined soybean oil (EPA) and penetrating surfactant in aqueous solution (Inex-A). Also, the colony forming units (UFC) of each preparation, quantified by Neubauer were determined.

Antagonism *in vitro* tests. Following the modified methodology Hsiang *et al.* (2004), cross-sections were performed with razor in the stereomicroscope gladiolus leaves with pustules *U. transversalis* approximately 3X7 cm. Each cut was deposited on a plastic base disinfected with sodium hypochlorite (NaClO). It was placed in each cut using a micropipette 0.7  $\mu\text{L}$  of the suspension of each antagonist UFC on each pustules, previously counting the total number of these. Once poured drop UFC, they cut the tissue passed along with the plastic bases in Petri dishes containing agar-water acidified with lactic acid 25%, incubated for 5 days under germination chamber at a temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The colonization of antagonists was observed every 24 h under stereomicroscope.

Percentage colonization. The final evaluation was considered at 5 days, when the pathogen completely covered the pustule and tissue culture maintain turgor,

**Microscopía.** Se realizaron montajes temporales de cortes de los crecimientos fúngicos exitosos de los antagonistas sobre las pústulas de *U. transversalis*. Los cortes se tiñeron con azul de algodón al 0.5% y fueron fotografiados en un microscopio compuesto con el software PixelPro Versión 1.1.0.

**Análisis estadístico.** Con la información de las variables de estudio obtenidas, con un modelo de bloques completamente al azar, se realizaron los análisis de varianza de acuerdo al modelo que contempla el diseño utilizado (Littell *et al.*, 1996), y cuando la prueba de F de los análisis de varianza resultó significativa, se procedió a realizar la prueba de medias utilizando para esto, la diferencia mínima significativa honesta (DMSH) de la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) (Palaniswamy y Palaniswamy, 2006).

## Resultados y discusión

**Distribución y severidad de la enfermedad.** De la evaluación de severidad de las plantaciones de gladiolo muestreados en 15 cultivos comerciales de los municipios de Zumpahuacán, Jocotitlán, Malinalco, Villa Guerrero e Ixtlahuaca, se obtuvo un grado de infección que varió de 22% en Villa Guerrero a 91.7% en Malinalco (Cuadro 2). La enfermedad se detectó en las etapas de floración, cosecha y poscosecha, sin tener algún registro en plantaciones jóvenes.

**Cuadro 2. Daño causado por *U. transversalis* en gladiolo, por municipio.**  
**Table 2. Damage caused by *U. transversalis* on gladiolus, by municipality.**

Parcela	Municipio	Localización UTM		Altura (msnm)	(% ) infección
		Oeste	Norte		
1	Villa Guerrero	433733	2086880	1 805	58.3
2		435122	2082342	1 690	58.3
3		434632	2085583	1 765	22
4	Zumpahuacán	436328	2089118	1 816	66.7
5		336768	2088910	1 830	50
6		436778	2088809	1 824	53.6
7	Malinalco	450421	2090713	1 950	91.7
8		450671	2088913	1 900	83.3
9		450434	2079613	1 920	75
10	Jocotitlán	421022	2171564	2 552	70.8
11		421762	2179864	2 480	063.9
12		421894	2167964	2 305	41.7
13	Ixtlahuaca	423941	2173865	2 549	50
14		433941	2175695	2 620	58.3
15		427641	2173995	2 584	59.7

using the formula: (%) colonization= (No. of pustules colonized/No. total pustules) X 100, formula adapted from Phillips and Hayman (1970).

**Microscopy.** They mount temporary cuts of successful antagonists fungal growths on *U. transversalis* pustules were made. The sections were stained with cotton blue 0.5% and were photographed in a compound microscope with software PixelPro Versión 1.1.0.

**Statistic analysis.** With the information of the study variables obtained, with a block model completely random variance analysis according to model that includes the design used were made (Littell *et al.*, 1996), and when the test F analysis of variance was significant, we proceeded to perform the test means using for this, the minimum difference honest significant (DMSH) Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) (Palaniswamy and Palaniswamy, 2006).

## Results and discussion

**Distribution and severity of disease.** Assessment of severity of plantations sampled gladiolus in 15 commercial crops in the municipalities of Zumpahuacan, Jocotitlan, Malinalco, Villa Guerrero and Ixtlahuaca, a degree of infection was obtained that ranged from 22% in Villa Guerrero to 91.7% in



Estadísticamente, se observaron efectos significativos ( $p \leq 0.05$ ) en el porcentaje de daño de los 5 municipios evaluados, siendo el municipio de Malinalco el que presentó mayor porcentaje de infección (Cuadro 3).

De acuerdo a la altitud de los municipios, es evidente la diferencia porcentual en el grado de infección por roya. Si bien, la zona florícola de Villa Guerrero ocupa la mayor superficie del cultivo para venta nacional y extranjera (Aquino y Ríos, 2010), también es el municipio de mayor uso de fungicidas, insecticidas y herbicidas sintéticos que a la par con buenas prácticas de manejo del cultivo pudieran explicar el bajo (%) de infección en comparación al resto de los municipios, que se anteceden con menor tiempo de introducción del gladiolo para su producción. Además la reciente introducción del cultivo a los municipios de Malinalco y Jocotitlán, así como el uso de fungicidas sintéticos podría favorecer la aparición de hongos fitopatógenos resistentes, tal como lo menciona Vásquez *et al.* (2013).

En las observaciones de campo se notó que algunas de estas plantaciones se encontraban deficientemente manejadas por los productores. De lo cual se asume que si la enfermedad no se combate oportunamente, puede ocasionar la pérdida total del cultivo, tal como los registros de Schubert *et al.* (2006). Aquino y Ríos (2010) y el CESAVEM (2007), quienes reportan a Ixtlahuaca y Jocotitlán como municipios aparentemente libres de roya. Sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos, estos municipios presentaron un porcentaje de infección mayor a 50%.

Aislamiento e identificación de hongos antagonistas. De las muestras de las localidades de Villa Guerrero (3 cepas) y Zumpahuacán (5 cepas), se obtuvieron ocho aislamientos de hongos antagonistas asociados a roya. El total de cepas de hongos antagonistas empleados fueron diez, cinco cepas del género *Cladosporium* sp, una del género *Aspergillus* sp, otra de *Alternaria* sp. y tres del género *Trichoderma* sp. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por García *et al.* (2005), quienes obtuvieron cepas nativas de *Cladosporium*, de la parte foliar de crisantemo infectado por *Puccinia horiana*. Los ecosistemas agrícolas contienen gran cantidad y diversidad de microorganismos benéficos Duffy *et al.* (2003), por lo que no es raro que se hayan aislado hongos antagonistas de todas las muestras de flores y hojas colectadas. El efecto inhibitorio de los hongos antagonistas hacia los patógenos, se midió con el crecimiento de los primeros, a

Malinalco (Table 2). The disease was detected in the stages of flowering, harvest and postharvest, without any record in young plantations.

Statistically significant effects were observed ( $p \leq 0.05$ ) in the percentage of damage of the 5 municipalities evaluated, with the municipality of Malinalco presented the highest percentage of infection (Table 3).

**Cuadro 3. Porcentaje de infección en hojas de Gladiolo por *U. transversalis* por municipio.**

**Table 3. Percentage of infection in leaves *Gladiolus* by *U. transversalis* by municipality.**

Localidad	(%) infección
Villa Guerrero	46.2 ± 17.11 <sup>b</sup>
Zumpahuacán	56.78 ± 7.17 <sup>ab</sup>
Malinalco	83.33 ± 6.81 <sup>a</sup>
Jocotitlán	58.8 ± 12.41 <sup>ab</sup>
Ixtlahuaca	56 ± 4.28 <sup>ab</sup>

† Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

According to the altitude of the municipalities, it is clear the percentage difference in the degree of rust infection. While the floriculture area of Villa Guerrero occupies the largest area of cultivation for domestic and foreign sales (Aquino and Ríos, 2010), it is also the municipality of increased use of fungicides, insecticides and synthetic herbicides par with best practices crop management could explain the low (%) of infection compared to other municipalities, which predate less time gladiolus introduction for production. In addition the recent introduction of the crop to the municipalities of Malinalco and Jocotitlán, as well as the use of synthetic fungicides could favor the emergence of resistant fungal pathogens, as mentioned Vásquez *et al.* (2013).

In the field observations was noted that some of these plantations were poorly handled by producers. Of which it is assumed that if the disease is not combat time, can cause the total loss of the crop, such as records of Schubert *et al.* (2006). Aquino and Ríos (2010) and CESAVEM (2007), who report to Ixtlahuaca and Jocotitlan as apparently free of rust municipalities. However according to the results, these municipalities had a percentage greater than 50% infection.

Isolation and identification of antagonistic fungi. Samples of the towns of Villa Guerrero (3 strains) and Zumpahuacan (5 strains), eight isolates of antagonistic fungi associated

partir de este análisis se seleccionaron únicamente seis cepas para proceder a la evaluación de la interacción antagónica *in vitro* (Cuadro 4).

with rust were obtained. The total fungal strains antagonists employees were ten, five strains of the genus *Cladosporium* sp, one of the genus *Aspergillus* sp, another *Alternaria* sp,

**Cuadro 4. Aislamientos de hongos antagonistas identificados por planta hospedera y localidad muestreada.**  
**Table 4. Isolation of antagonistic fungi identified by host plant and sampled locality.**

Cepa	Hospedero	Sitio de colecta	Clave
<i>Cladosporium</i>	Gladiolo	Zumpahuacán	CIGl
<i>Alternaria</i>	Gladiolo	Zumpahuacán	AltGl
<i>Aspergillus</i>	Gladiolo	Zumpahuacán	AspGl
<i>Trichoderma</i>	Zacate con avena	Toluca	TrZA
<i>Trichoderma</i>	Jitomate	Villa Guerrero	TrJi
<i>Trichoderma</i>	Pino	ICAMEX	TrPi

Los antagonistas utilizados para biocontrol de enfermedades son generalmente saprófitos, debido a su facilidad de adaptación al medio, su alta capacidad de competencia por nutrientes frente a otros microorganismos, su versatilidad y fácil manipulación. El hongo *Cladosporium* ha sido empleado como agente de biocontrol de la roya blanca (*Puccinia horiana*) del crisantemo, obteniendo una reducción de severidad en condiciones de invernadero de 41% y 84%, afectando la producción y liberación de basidiosporas (García *et al.*, 2005). El género *Trichoderma* ha sido reportado como agente de biocontrol de diversos hongos patógenos, principalmente del suelo, debido a su amplia distribución y alto rango de hospedantes (Howell, 2006; Aquino *et al.*, 2007; Hoyos *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2008).

Pruebas de antagonismo *in vitro*. Se observaron efectos altamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos de TrPi y las cepas CIGl y AspGl, en las diluciones de 300 mL. De las seis cepas probadas, TrPi invadió claramente el mayor número de pústulas. Los tratamientos de la dilución de 600 mL, no presentaron diferencias estadísticas, sin embargo las cepas AltGl, TrZA y TrPi presentaron un porcentaje de colonización superior a 50% (Cuadro 5). Pese a la mayor cantidad de UFC en la cepa de *Aspergillus* sp. (Cuadro 6), esta no influyó en su eficiencia biológica representada en el porcentaje de colonización. La cepa nativa AltGl presentó igual porcentaje de colonización, en ambas diluciones. Sin embargo, al no presentar diferencias en el porcentaje de colonización en las cepas empleadas bajo una dilución de 600 mL, todas las cepas son susceptibles a utilizarse con un porcentaje de eficacia

and three of the genus *Trichoderma* sp. These results agree with those found by García *et al.* (2005), who obtained native strains of *Cladosporium*, part of the leaf chrysanthemum infected *Puccinia horiana*. Agricultural ecosystems contain a large number and diversity of beneficial microorganisms Duffy *et al.* (2003), so it is not uncommon antagonistic fungi isolated from all samples of flowers and leaves have been collected. The inhibitory effect of antagonistic fungi to pathogens, was measured with the growth of the first, from this analysis only six strains were selected to proceed with the evaluation of the antagonistic interaction *in vitro* (Table 4).

The antagonists used for biocontrol of diseases are generally saprophytes, due to its ease of adaptation to the environment, its high nutrient competition against other microorganisms, versatility and easy handling. The *Cladosporium* fungus has been used as a biocontrol agent of white rust (*Puccinia horiana*) of chrysanthemum, obtaining a reduction of severity under greenhouse conditions of 41% and 84%, affecting the production and release of basidiospores (García *et al.*, 2005). The genus *Trichoderma* has been reported as a biocontrol agent of various pathogenic fungi, especially soil, due to its wide distribution and high host range (Howell, 2006; Aquino *et al.*, 2007; Hoyos *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2008).

Antagonism *in vitro* tests. The highly significant ( $p \leq 0.05$ ) between treatments TrPi and CIGl and AspGl strains in dilutions of 300 mL were observed. The strains tested six, TrPi clearly invaded the largest number of pustules. Treatments dilution of 600 mL, were not statistically different, however AltGl, TrZA and TrPi strains showed a percentage greater than 50% colonization (Table 5).

promedio de 51.2%, y en general la preparación de las cepas antagonistas de la roya transversal será más eficiente a una dilución de 300 mL.

**Cuadro 5. Porcentaje de colonización (efectividad biológica) de dos concentraciones de UFC de seis hongos antagonistas sobre *U. transversalis*.**

**Table 5. Percentage of colonization (biological effectiveness) of two concentrations of UFC of six antagonistic fungi on *U. transversalis*.**

Cepa	(%) col (600 mL)	(%) col (300 mL)
ClGI	47.7 ± 21.68 <sup>a</sup>	45.36 ± 15.11 <sup>b</sup>
AltGI	60.2 ± 17.69 <sup>a</sup>	60.2 ± 17.24 <sup>ab</sup>
AspGI	41.7 ± 21.40 <sup>a</sup>	44.54 ± 26.3 <sup>b</sup>
TrZA	56 ± 25.57 <sup>a</sup>	62.67 ± 20.25 <sup>ab</sup>
TrJi	48.8 ± 21.00 <sup>a</sup>	53.73 ± 14.16 <sup>ab</sup>
TrPi	53.2 ± 23.74 <sup>a</sup>	67.62 ± 24.84 <sup>a</sup>

† Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Although as many UFC strain *Aspergillus* sp. (Table 6), this did not influence their biological efficiency displayed in the percentage of colonization. The native strain AltGI equal percentage of colonization presented in both dilutions. However, bearing no differences in the percentage of colonization strains employed under a dilution of 600 mL, all strains are susceptible to be used with a percentage of average efficiency of 51.2%, and generally preparing antagonistic strains of cross rust will be more efficient at a dilution of 300 mL.

The antagonistic capacity of some strains of fungi to plant pathogenic fungi can be defined based on the total or partial destruction of pathogen populations (Cook and Baker, 1983). This ability is the result of the aggressiveness of the antagonist and the susceptibility of the pathogen (Paul, 1999). Regarding the cross sections of fungal growth on Sempere and Santamarina (2008), pustules mention that the antagonistic capacity is evident from the observed variation

**Cuadro 6. Total de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.**

**Table 6. Total colony forming units (UFC) per milliliter.**

Dilución 1 (600 ml)		Dilución 2 (300 ml)	
Cepa	UFC/10 µl	Cepa	UFC/10 µl
ClGI	236.8X10 <sup>6</sup>	ClGI	521.6X10 <sup>6</sup>
AltGI	166.4X10 <sup>6</sup>	AltGI	470.4X10 <sup>6</sup>
AspGI	183X10 <sup>9</sup>	AspGI	3.369X10 <sup>9</sup>
TrZA	134.4X10 <sup>6</sup>	TrZA	371.2X10 <sup>6</sup>
TrJi	160X10 <sup>6</sup>	TrJi	348.8X10 <sup>6</sup>
TrPi	332.8X10 <sup>6</sup>	TrPi	608X10 <sup>6</sup>

La capacidad antagónica de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos (Cook y Baker, 1983). Esta capacidad es el resultado de la agresividad del antagonista y de la susceptibilidad del patógeno (Paul, 1999). Respecto a los cortes transversales de los crecimientos fúngicos sobre las pústulas Sempere y Santamarina (2008), mencionan que la capacidad antagónica se hace evidente por la variación observada con respecto a la selectividad de algunas cepas de hongos. En las observaciones microscópicas de las zonas de colonización, las seis cepas evaluadas, produjeron variaciones como deshidratación, degradación y deformación de uredias y urediosporas.

with respect to the selectivity of some strains of fungi. In microscopic observations of the settlement areas, the six strains tested produced variations such as dehydration, degradation and deformation of uredinia and urediospores.

The pustules cuts indicated that the six strains antagonists mycelium developed within *U. transversalis* pustule suggesting that act as hyperparasites fungi in uredia (Figure 1), which agrees with García *et al.* (2005), with *Cladosporium*, who report that even if microscopic observations indicated that acts as a hyperparasite *Cladosporium*, not the possibility that antagonism of this fungus other mechanisms such as the production of antibiotics, enzymes and toxic metabolites involved discarded. Several of microorganisms used as



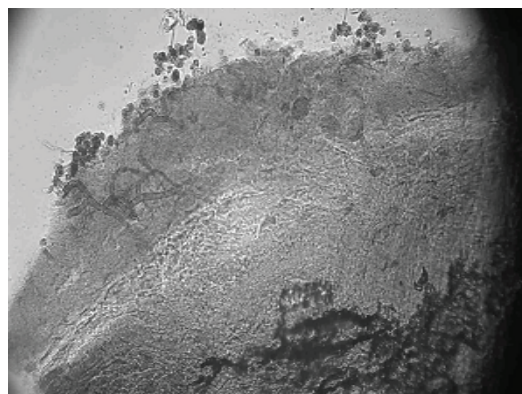
Los cortes de las pústulas indicaron que las seis cepas antagonistas desarrollaron micelio dentro de las pústula de *U. transversalis* sugiriendo que los hongos actúan como hiperparásitos en las uredias (Figura 1), lo cual concuerda con García *et al.* (2005), con *Cladosporium*, quienes mencionan que aun cuando las observaciones microscópicas indicaron que *Cladosporium* actúa como un hiperparásito, no se descarta la posibilidad de que en el antagonismo de este hongo se involucren otros mecanismos, como la producción de antibióticos, metabolitos tóxicos y enzimas. Varios de los microorganismos utilizados como agentes de control biológico producen metabolitos secundarios que afectan el crecimiento o germinación mediante la producción de antibióticos y/o enzimas que degradan pared celular (Assante *et al.*, 2004), por lo que sería recomendable realizar estudios de investigación con las cepas que se evaluaron en la presente investigación.

Spiegel y Chet (1998); Hermosa *et al.* (2000); Rey *et al.* (2000), han descrito los mecanismos por lo que las cepas del género *Trichoderma* sp, desplazan a fitopatógenos, presentándose en esta evaluación el parasitismo directo. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas AltGI, TrFCA y TrPi, actuaron como los más eficientes antagonistas de la roya transversal (*U. transversalis*) en condiciones de laboratorio, sin embargo, será conveniente determinar si en condiciones de invernadero y de campo, prevalece su establecimiento y eficiencia biológica en varios municipios. Es necesario complementar la investigación con un enfoque polifásico que comprenda no solo características morfológicas, sino también bioquímicas y moleculares de las cepas de estudio de acuerdo con lo establecido por Arrúa *et al.* (2012).

## Conclusiones

La roya transversal por *Uromyces transversalis* se encuentra distribuida en los cultivos comerciales de gladiolo de cinco municipios de producción florícola del estado de México con una severidad de 22 a 91.7%. Por otra parte, los hongos antagonistas asociados a la roya transversal son: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp y *Aspergillus* sp. La inoculación *in vitro* de las pústulas de *Uromyces transversalis* con los aislamientos TrPi ( $608 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} \text{ UFC}$ ), TrZA ( $371.2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} \text{ UFC}$ ) y AltGI ( $470.4 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} \text{ UFC}$ ), presentaron la mayor colonización de pústulas de roya cuyos valores de acuerdo a las cepas fueron de 67.6, 62.6 y 60.2%, en condiciones controladas

biological control agents produce secondary metabolites that affect growth or germination by producing antibiotics and/or enzymes degrading cell wall (Assante *et al.*, 2004), it would be advisable to conduct research with strains that were evaluated in this investigation.



**Figura 1. Observación en microscopio compuesto de la invasión de *Trichoderma* de Pino (TrPi) en el tejido y uredias de *U. transversalis* a los cinco días de incubación (40X).**

**Figure 1. Observation in microscope compound invasion *Trichoderma* Pine (TrPi) in tissue and uredia of *U. transversalis* five days of incubation (40X).**

Spiegel and Chet (1998); Hermosa *et al.* (2000); King *et al.* (2000), they have described the mechanisms by which *Trichoderma* sp strains, displace phytopathogenic, appearing in this evaluation direct parasitism. The results suggest that AltGI, TrFCA and TrPi, strains acted as the most efficient antagonists any cross rust (*U. transversalis*) under laboratory conditions, however, be appropriate to determine whether in the greenhouse and field prevails his establishment and biological efficiency in various municipalities. You need to be supplemented with a multi-phase research approach that includes not only morphological characteristics but also biochemical and molecular study of the strains according to the provisions Arrua *et al.* (2012).

## Conclusions

The cross rust by *Uromyces transversalis* is distributed in cash crops gladiolus flower production five municipalities in State of Mexico with a severity of 22 to 91.7%. Moreover, antagonists fungi associated transverse rust are: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. and *Aspergillus* sp. The *in vitro* inoculation of *Uromyces transversalis* pustules with TrPi ( $608 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} \text{ UFC}$ ), TrZA ( $371.2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1} \text{ UFC}$ ) and AltGI ( $470.4 \times 10^6$

de 25 °C ± 2 °C durante cinco días. Asimismo, se observó que el modo de acción de los hongos antagonistas fue por hiperparasitismo.

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), y destacadamente al Dr. Jesús G. Aquino Martínez.

## Literatura citada

- African Business Magazine. 2012. The global flower trade. Disponible en línea: <http://africanbusinessmagazine.com/special-reports/sector-reports/floriculture/the-global-flower-trade>.
- Aquino, M. J. G. y Ríos, D. M. H. 2010. Guía para el manejo de la roya transversal del gladiolo en el Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal. Estado de México. 3-12 pp.
- Aquino, M. J. G.; Vázquez, G. L. M y Reyes, R. B. G. 2007. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Synder y Hans. con hongos antagonistas ativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Rev. Mex. Fitopatol. 26(2):127-132.
- Arrúa, A. A.; Moreno, M. E.; Quezada, V. M.; Moreno, L. J; Vázquez, B. Y. y Flores, O. A. 2012. *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. Rev. Mex. Fitopatol. (3(4):1043-1049.
- Assante, G.; Maffi, D.; Saracchi, M; Farina, G.; Moricca, S. and Ragazzi, A. 2004. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. British Mycol. Soc. 108:170-182.
- Barnett, H. L. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4<sup>a</sup> Ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 182 p.
- CESAVEM. 2005. Resultados del muestreo de la roya transversal del gladiolo en el Estado de México. 1-12 pp.
- CESAVEM. 2007. Resultados del muestreo de la roya transversal del gladiolo en el Estado de México. 1-12 pp.
- CESVMOR. 2006. Boletín técnico sobre la campaña “caracterización fitosanitaria de ornamentales en el cultivo del gladiolo” Cuernavaca, Morelos, México. 94 p.
- Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society; St. Paul, Minnesota. 539 p.
- Duffy, B; Shouten, A and Raaijmakers, J. M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Ann. Rev. Phytopatol. 41:509-521.
- mL<sup>-1</sup> UFC), isolates presented the greater colonization of pustules rust whose values according to the strains were 67.6, 62.6 and 60.2%, under controlled conditions of 25 °C ± 2 °C for five days. It was also noted that the mode of action of the antagonist's fungi was by hyperparasitism.

*End of the English version*



- Escalante, E. L.; Escalante, E. Y; Linzaga E. C & Carreño, R. E. 2006. Efecto de diferentes dosis de sulfato de amonio en el rendimiento del gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* L.). Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero; Iguala Guerrero. 5 p.
- Flores, C. M. A.; Martínez, D. M. T; Nieto, Á. D; Rodríguez, P. J. E; Colinas, L. M. T & Martínez, S. J. 2013. Reducción en la germinación *in vitro* de conidios de *Alternaria alternata* aislada de *Eruca sativa* con jugo de brócoli. Rev. Mex. Fitopatol. 31(2): 80-190.
- García, V. R; Zavaleta, M. E; Rojas, M. R; Leyva, M. S. G; Kilpatrick, S. J & Fuentes, D. G. 2005. Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Rev. Mex. Fitopatol. 23(1):79-86.
- García, A. F. 2007. Eficiencia de fungicidas en el control de la roya transversal *Uromyces transversalis* (Thum.) Winter, del gladiolo en Villa Guerrero, México. 102 p.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. St. Paul. 96:190-194.
- Hermosa, M. R.; Grondona, I.; Iturriaga, E. A.; Díaz, M. J.; Castro, C.; Montes, E. and García, A. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology, Washington. 66:1890-1898.
- Howell, C. 2006. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and Damping - Off of cotton seedlings. *Phytopathology*, St. Paul. 72:496-498.
- Hoyos, C. L.; Chaparro, P.; Abramsky, M.; Chet, y Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agron. Colomb.* 26(3):451-458.
- Hsiang, T.; Cook, S. and Zhao, O. 2004. Studies on biology and control of daylily rust in Canada. *The Daylily Journal*. EE. UU. 59:47-57
- Litell, R. C.; Milliken, G. A.; Stroup, W. and Wolfinger, R. D. 1996. SAS® system for mixed models. Cary, NC: SAS Institute Inc. 663 p.
- Núñez, C. D. and Romero, C. S. 1980. Estudio sobre control biológico de *Fusarium roseum* (Lk) Synder & Hansen, causante principal de la dormilona del clavel en Villa Guerrero, Estado de México. *Agrociencia*. 39:25-33.
- Palaniswamy, U. R. and Palaniswamy, K. M. 2006. Handbook of statistics for teaching and research in plant and crop science. The Harworth, Press, Inc., New York. 624 p.
- Paul, B. 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiousum*. *Federal of European Microbiological Societies. Microbiology Letters. Europe.* 176:25-30.

- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Brit. Mycol. London. Soc.* 55:158-161.
- Quiroz, S. V. S.; Ferrera, C. R.; Alarcón, A. y Lara, H. M. E. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Rev. Mex. Micol.* 26:27-34.
- Rey, M.; Delgado, J. J.; Rincón, A. M.; Limón, M. A. y Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como fungicidas. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:31-36.
- Rodríguez, G.; Fernández, S. P.; Valenzuela, M. and Loya, G. J. 2006. First report of gladiolus rust caused by *Uromyces transversalis* in Michoacán. *Plant Dis.* 5:687.
- SAGARPA. 2005. Horticultura del Estado de México. <http://www.infoagro.com/flores/flores/gladiolo.htm>.
- Schubert, T.; Leahy, R. and Silagyi, A. 2006. Pest alert. Gladiolus rust (*Uromyces transversalis*) arrives in the US: Florida and California. 167 p.
- Sempere, F. and Santamarina, M. P. 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berck & Broowe) Petch. by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium* Curve & Thom. *International Journal of Food Microbiology. Australia.* 122:35-43.
- Spiegel, Y. and Chet, I. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews.* New York. 3:169-175.
- Torres, E.; Iannacone, J. and Gómez, H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia.* 67(1):169-178.
- Vásquez, C. D. A.; Montes, B. R.; Jiménez, P. A. y Flores, M. H. E. 2013. Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31(2):170.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.