



"Enseñar la explotación de la
tierra, no la del hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**PATÓGENOS ASOCIADOS AL FOLLAJE Y
SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. EN EL ESTADO
DE PUEBLA**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

PRESENTA:

VICENTE NOLASCO GUZMÁN



DIRECCION GENERAL ACADEMICA/
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México. Julio de 2013



ESTA TESIS TITULADA: **PATÓGENOS ASOCIADOS AL FOLLAJE Y SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. EN EL ESTADO DE PUEBLA**, FUE REALIZADA POR EL ALUMNO **VICENTE NOLASCO GUZMÁN**, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA **DRA H. GLORIA CALYECAC CORTERO**, Y HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL SIGUIENTE JURADO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Jurado

Director



Dra. H. Gloria Calyecac Cortero

Asesor



Dr. Samuel Ramírez Alarcón

Asesor



M. C. Victoria Ayala Escobar

Asesor



M. C. Juan Manuel Tovar Pedraza

Chapingo, México. Julio, 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (**CONACYT**), por el apoyo brindado durante el curso de la maestría, debido a que sin la beca otorgada, no hubiera sido posible continuar con mis estudios.

A la Universidad Autónoma Chapingo (**UACH**) y el Departamento de Parasitología por haberme dado la oportunidad y brindarme las facilidades de formarme y obtener el grado de Maestro en Ciencias.

A la **Dra. H. Gloria**, quien además de la paciencia y guía durante la presente investigación, ha sido un ejemplo de esfuerzo, dedicación y de que también me enseñó el valor de la familia.

Al **Dr. Samuel**, por su apoyo en la culminación de este trabajo.

A la **M. C. Victoria Ayala**, por la confianza y apoyo brindado, así como las aportaciones y consejos oportunos, durante la realización de este trabajo de investigación.

A los profesores de la Maestría en Protección vegetal por contribuir en mi formación académica y humana, y compartir sus conocimientos y experiencias profesionales.

Al **Dr. Jesús A. Cuevas** por su confianza y apoyo brindado, por poner a disposición los materiales y recursos a su alcance, para la realización de este trabajo, además de ofrecer su amistad tan valiosa.

Al **MC. Juan Manuel Tovar**, por su apoyo y sus valiosas aportaciones para la realización del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mi **Padre**, quien ha estado siempre junto a mí en cada decisión que he tomado iluminado por sus sabios consejos, los cuales hasta ahora sigo tratando de entender.

A mi **Madre** quien me dio la vida, quien me enseñó a luchar por los sueños.

A mis **Hermanos y Hermanas** por su apoyo incondicional en las decisiones tomadas y palabras de aliento recibidas en todo momento.

A mis **Amigos** con quienes he compartido momentos importantes a lo largo de mi vida y en quienes me he apoyado en situaciones adversas, porque también son parte de mi familia y quienes espero conservar.

A mis **Profesores** de quienes he aprendido algo más que realizar agricultura, sino también quienes me han enseñado filosofía de vida.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por haberme proporcionado las facilidades y los medios necesarios para crecer como persona, y como un recurso humano capaz de contribuir al desarrollo del país.

DATOS BIOGRÁFICOS

Vicente Nolasco Guzmán, nació en 5 de abril de 1983 en la comunidad de Xochitlán de Vicente Suarez, en el Estado de Puebla. Realizó sus estudios de Bachillerato de 2001 a 2004 en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 168 “Clara Z. Córdova Morán”, ubicada en el municipio de Zacapoaxtla, Estado de Puebla. Ingreso en el año 2005 a la Universidad Autónoma Chapingo y concluyó sus estudios como Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en el año 2010. En el 2011 ingreso al programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en la misma Universidad donde concluyó sus estudios en el año 2012.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
RESUMEN GENERAL	2
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Objetivo General.....	4
Objetivos particulares	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Origen y distribución de <i>Jatropha curcas</i> L.....	5
Importancia	6
Características botánicas.....	7
Ecotipos.....	10
Condiciones ambientales	11
Problemas fitosanitarios	12
Enfermedades	13
Hongos fitopatógenos en el suelo	16
LITERATURA CITADA	17
CAPITULO 1	23
DIVERSIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE <i>Jatropha curcas</i> L. COLECTADAS EN LOS ESTADOS DE PUBLA, VERACRUZ Y CHIAPAS	23
RESUMEN.....	23
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Obtención de semillas.....	25
Aislamiento de hongos	26

Purificación y conservación de hongos	26
Identificación de hongos	27
Frecuencia de hongos	27
Pruebas de patogenicidad	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Calidad de semilla	29
Hongos aislados de semillas	32
Pruebas de patogenicidad	43
LITERATURA CITADA	45
CAPITULO 2	49
RESUMEN	49
ABSTRACT	49
INTRODUCCIÓN	50
MATERIALES Y MÉTODOS	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
LITERATURA CITADA	56
CONCLUSIONES GENERALES	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de semillas con crecimiento fungoso, para cada colección, y de acuerdo a cada tratamiento (desinfestadas y no desinfestadas).....	31
Figura 2. (A) Crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> en semilla de <i>J. curcas</i> en cámara húmeda. (B) Colonia de <i>L. theobromae</i> cultivada en medio de cultivo PDA. (C) Conidio en desarrollo de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	36
Figura 3. Semillas de <i>J. curcas</i> (Colección CAZ 2-2012) con crecimiento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a 5 días después de ser colocadas en cámara húmeda.	37
Figura 4. (A) Crecimiento micelial de <i>Phomopsis</i> sp. en semillas de <i>J. curcas</i> colocadas en cámara húmeda. (C) Crecimiento en caja petri sobre medio PDA.	39
Figura 5. (A) Esporulación de <i>Aspergillus</i> spp. en semilla en la cámara húmeda. (B) Crecimiento en caja Petri, sobre medio PDA.	41
Figura 6. Estructuras reproductivas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en el cuello de la plántula y plántulas de <i>J. curcas</i> semisecas, dos meses después de la inoculación de fragmentos miceliales.	44
Figura 7. Síntomas y signos de <i>Phakopsora arthuriana</i> en <i>Jatropha curcas</i>. (A) Síntomas iniciales en superficie abaxial de una hoja. (B) Síntomas severos en superficie abaxial de una hoja, mostrando necrosis y abundantes uredios. (C-D) Uredios con urediniosporas. (E) Paráfisis uredinales. (F) Telio con teliosporas. (G) Picnidio de <i>Sphaerellopsis filum</i> en cavidad uredinial.	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Agente causal, daño y fuente, de problemas fitosanitarios en <i>J. curcas</i>	13
Cuadro 2. Relación de colectas de <i>J. curcas</i> que se utilizaron para la identificación de hongos asociados a las semillas.....	25
Cuadro 3. Porcentaje de semillas con crecimiento fungoso, bajo tratamiento con cloro y sin tratamientos, para cada colección.	30
Cuadro 4. Frecuencia de hongos asociados a la semilla de diferentes colecciones de <i>J. curcas</i>	33

PATÓGENOS ASOCIADOS AL FOLLAJE Y SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. EN EL ESTADO DE PUEBLA

PATHOGENS ASSOCIATED TO *Jatropha curcas* L. LEAVES AND SEEDS IN PUEBLA STATE.

Vicente Nolasco Guzmán y H. Gloria Calyecac Cortero

RESUMEN GENERAL

De 2010 a 2012, se tomaron muestras de raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas de parcelas establecidas en asociación con diferentes cultivos. El objetivo fue determinar los daños de diferentes patógenos presentes, así como las que se encuentran presentes en semillas. En las hojas se detectó la presencia de roya *Phakopsora arthuriana*, causando hasta 85% de defoliación, e hiperparasitado por *Sphaerellopsis filum*; también se detectó *Colletotrichum gleosporioides*. *Lasiodiplodia theobromae* se encontró en tallos; *Fusarium* spp. se encontró causando pudrición en raíces y follaje. En semillas se detectaron *Fusarium* spp., *Colletotrichum gleosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp., *Curvularia* sp, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp, *Gliocladium* sp, *Chaetomium* sp, con una incidencia que varió de 62 a 95% en semillas sin desinfectar y de 32.5 a 90% en las desinfectadas.

Palabras clave: Biocombustibles, *Jatropha curcas*, hojas, semillas, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

In 2010 and 2012, some leaves samples were taken in *J. curcas* intercropping plots. The goal was to determinate wich pathogens are causing damage, in their different structures. Seeds samples were made for detect and compare probably presence of pathogenic fungal spores. Roya (*Pakopsora arthuriana*) was detected in leaves samples causing almost total defoliation in 85% of the plants at the end in the fruit development. *Colletotrichum gleosporioides*. *Lasiodiplodia theobromae* was detected causing damage in stems. *Fusarium* spp. was detected causing less level of damage in fruits and leaves. The most pathogenic fungus was detected in both samples seeds; treated with sodium hypochlorite and others without treatment showing different incidences (4 a 85%), the fungus presented were; *Fusarium oxisporum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp, *Curvularia* sp, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp, *Gliocladium* sp, *Chaetomium* sp.

Key words: *Jatropha curcas*, pathogenic fungus, seeds diseases, biofuels

¹ Tesista, Posgrado en Protección Agrícola Vegetal. Parasitología Agrícola. UACH.

² Director. Profesor-Investigador, Preparatoria Agrícola. UACH.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Jatropha curcas L. es una especie perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, que empieza a tomar importancia agrícola y que se empieza a cultivar en diferentes partes del mundo, debido al contenido de aceite que contiene su semilla y la calidad de estas para la producción de biodiesel. En México se desarrolla en regiones costeras, con clima tropical y subtropical, de 0 a 1300 msnm. En Chiapas y Oaxaca existe genotipos tóxicos, los genotipos no tóxicos se distribuyen en Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Quintana Roo, Guerrero, Michoacán, Sinaloa, Sonora, Puebla, Hidalgo y Morelos (Martínez, 2006). Los ésteres de forbol son los responsables de la toxicidad de la semilla (Makkar *et al.*, 1997). En la región del Totonacapan de Veracruz y Puebla a *J. curcas* se le conoce como chuta, chota o chut, nombres de origen totonaco o bien naxtli, nombre de origen náhuatl; la semilla es consumida tostada o bien en la preparación de comidas como salsas, pipián y tamales. La savia es de uso medicinal, para sanar heridas; además se utiliza como tutor del cultivo de vainilla (Bautista, 2007).

De los organismos asociados se encuentran hongos saprofitos, fitopatógenos e hiperparásitos, y que son potencialmente importantes para el control biológico, principalmente para hongos fitopatógenos. El hiperparasitismo de hongos son frecuentes en diferentes patosistemas principalmente en donde se encuentran especies del Orden Uredinales (Sandoval, 2001). *Darluca filum*, *Cladosporium uredinicola*, *Trichothecium roseum*, *Penicillium* sp., han sido reportados colonizando uredosoros de royas de las especies *Melampsora larici-populina*, *Chrysomyxa abietis*, *Uromyces phaseoli* y *Puccinia melanocephala* (Sandoval, 1990).

Debido a que la planta, en últimos años se ha empezado a establecer en grandes extensiones, de forma comercial, se ha incrementado los problemas fitosanitarios que presenta la planta, siendo los más comunes: la pudrición de raíces, cuello y tallo, causados principalmente por hongos, en el follaje, frutos y flores también se tienen problemas de enfermedades causados por hongos, además de insectos plaga que se alimentan de las estructuras, así como la dispersión de esporas de los hongos. Bajo este comportamiento de los insectos, cumplen dos propósitos en de plaga al causar daños físicos a las hojas, frutos y flores al momento de alimentarse, y el de dispersores de enfermedades, ya que por su movilidad viajan grandes distancias relativamente, y en este viaje transportan esporas de diferentes hongos en su cuerpo, además de favorecer su penetración al cultivo al momento de alimentarse.

Debido a lo anterior, diagnosticar y ubicar las vías de transmisión de las enfermedades, y principalmente ubicar la presencia de esporas o estructuras de reproducción en semillas, posibles fuentes de infección y de transmisión hacia nuevas plantaciones, relacionando también la presencia de enfermedades en las plantas madre y las esporas encontradas en las semillas. Por lo que para este trabajo se propuso como objetivo general la de identificar algunos hongos fitopatógenos en semillas provenientes de diferentes colectas, así como la relación que existe entre las enfermedades presentes en las parcelas muestreadas, tanto en raíz y follaje.

Objetivo General

- Identificar los hongos asociados a las semillas de *J. curcas* de diferentes colecciones.

Objetivos particulares

- Identificar los hongos fitopatógenos que puede ser transmitidos a través de las semillas, al momento de transportar de una parcela a otro.
- Identificar los hongos que pueden demeritar la calidad de semilla en almacén.
- Determinar e identificar los patógenos causantes de los daños en follaje de *Jatropha curcas*, en las parcelas de la región.
- Determinar la patogenicidad de cada organismo aislado, mediante la aplicación de los postulados de Koch.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen y distribución de *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas, es una especie de la familia Euphorbiaceae, del Genero *Jatropha* integrada por aproximadamente 175 especies descritas. La mayoría de estas especies se ubican en América, aunque también se han encontrado especies en África y Asia. *J. curcas* es una planta monoica, caducifolia y de porte arbustivo; que puede alcanzar desde dos hasta más de cinco metros de altura, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Heller, 1996).

De acuerdo a los reportes de diferentes investigadores, se considera que México es el posible Centro de origen de *Jatropha*, debido a que se registra abundantemente en zonas tropicales de América Central: Belice, Costa Rica, Guatemala, El Salvador,

Honduras, Panamá y México, en donde se han registrado la mayor presencia de especies (Heller, 1996).

En México, se localiza en las costas por el lado del Golfo de México, desde Tamaulipas y norte de San Luis potosí, incluyendo los Estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz. Por el Lado del Pacífico se encuentra en los Estados de Chiapas, Oaxaca, también se reportan colectas de los Estados de Tabasco, Yucatán, Michoacán, Sinaloa, Guerrero (Reyes, 2003).

Importancia

El interés comercial por la especie *J. curcas*, conocida en México como “Piñón”, inició desde la primera mitad del siglo XIX, principalmente por las aplicaciones del aceite de sus semillas en la elaboración de detergentes y como combustible para lámparas (Heller, 1996), aunque este uso del aceite principalmente en las regiones de la Sierra Norte del Estado de Puebla, fue decayendo principalmente por la introducción de la red eléctrica en zonas rurales pronunciadamente en la década de 1970 (Cuevas, 2010; comunicación personal).

Para el año 2000, esta planta nuevamente atrajo el interés de los investigadores, por la posibilidad de producir biodiesel a partir de su aceite, contenida en sus semillas (Henning, 2002; Toral *et al.*, 2008). En los años posteriores, el establecimiento de extensiones para su producción comercial en el Estado de Chiapas, así como en otros Países, comenzó con gran auge, por lo que en diferentes trabajos de investigación se

plantean objetivos con el fin de aclarar las diferentes capacidades ecológicas y ventajas económicas sobre esta especie.

El contenido de aceite en la semilla varía de acuerdo al tipo de clima en que se desarrolle. En países como Brasil, La India, Tailandia, Madagascar y otras regiones (fuera de México) donde se produce *J. curcas* (Casotti, 2008), el aceite extraído contiene cantidades letales de ésteres de forbol, por lo que es tóxico al consumo humano. En México, se encuentran materiales no tóxicos o con bajo contenido de ésteres de forbol, por lo que se pueden incluir en la alimentación humana, de hecho en comunidades indígenas Nahuas y Totonacas de los estados de Puebla y Veracruz, así como algunas regiones de San Luis Potosí, preparan platillos regionales usando estas semillas (Martínez *et al.*, 2004). En diferentes regiones de México, se utiliza para establecer cercas vivas, ya que se desarrolla rápidamente y se puede multiplicar por estacas, por lo que también puede utilizarse para reforestar (Reyes, 2003; Casotti, 2008).

Otros usos, es la medicinal, ya que la savia se le atribuyen propiedades curativas, tutor en el cultivo de vainilla (Bautista, 2010), asociación con otros cultivos como café, cacahuate, chíca, frijol, maíz, quelites, plátano (Cuevas, 2009; comunicación personal).

Características botánicas

J. curcas L. es una especie con una alta resistencia a condiciones extremas, por esta razón se cultiva extensamente en las zonas tropicales como cerca viva. Diferentes

partes de las plantas se emplea en la medicina tradicional. Sin embargo ciertos ecotipos tienen semillas tóxicas para los seres humanos así como para algunos animales (Reyes, 2003).

La planta demuestra crecimiento articulado, con una discontinuidad morfológica en cada incremento. La inactividad es inducida por fluctuaciones en la precipitación, temperatura y luz.

Es un arbusto caducifolio androdioico de 4-6 m de altura, el diámetro del tronco aproximado es de 14-18 cm en arbustos adultos con una corona delgada de ramas muy redondeada y extendida, las plantas jóvenes tienen una corona delgada e irregular, corteza externa lisa escamosa y muy delgada, de color pardo claro, con pequeñas lenticelas, corteza interna lisa verrugosa de color verde oscuro, látex blanquecino con sabor amargo, olor a hierba fresca; ramas de 3–5 cm de diámetro, de color verde claro y grisáceo con cicatrices marcadas.

Raíz: el sistema radical se conforma de principalmente por 4 raíces laterales y una principal en el centro y con raíces finas en abundancia, esta característica solo se observa en plantas a partir de semillas y sembradas directamente. En plantas germinadas en bolsas, aun siendo a partir de semillas, el crecimiento de las raíces pueden desarrollarse de diferente manera, ya que las raíces no se desarrollan de forma normal, o también pueden perder algunas raíces por la manipulación (Sharma, 2005). En las plántulas obtenidas a partir de estacas, las raíces solamente se desarrollan en la superficie, ya que las raíces formadas son principalmente adventicias y no se desarrollan de forma vertical.

Hoja: Las hojas adultas miden de 15 a 20 cm de largo y de 14 a 18 cm de ancho, son alternas con una duración de 7 a 8 meses, pentalobuladas, delgadas, glabras, haz de color verde claro con nervios mediales y secundarios color amarillo y ligeramente unidos, el envés de color verde opaco con los nervios mediales y secundarios muy pronunciados, el margen entero, el ápice agudo, la base cordada, pubescente por el envés, nerviación palmitífida, con cinco nervios principales originados desde la base de la hoja (Miller, 1962).

Flor: Las inflorescencias se forman terminalmente en el axial de las hojas en las ramas. Las flores masculinas están conformadas por diez estambres colocadas en dos espirales distintas de 5 cada uno en una sola columna en el androceo. Gineceo; las flores femeninas están compuestas por 3 estilos delgados conatos que están aproximadamente a dos tercios de su longitud, terminando en un estigma bifurcado macizo. Ambas flores, masculinas y femeninas, son pequeñas (6 a 8 mm), verdoso-amarillo y pubescentes. Los pétalos miden de 6 a 7 mm largo. La longitud del pecíolo es de 6 a 23 mm. En condiciones donde el crecimiento continuo ocurre un desequilibrio entre el número de flores masculinas y femeninas, produciendo un número más alto de flores femeninas. Son verdosas o blanco-amarillentas de 10 a 25 cm de largo y con un pedúnculo de 4 a 10 cm del largo. Las flores femeninas presentan brácteas acuminadas y las masculinas presentan brácteas aovadas y pedicelos pubescentes (Heller, 1996).

Fruto: Son cápsulas drupáceas y ovoides, trilocular es de forma elipsoidal. Las frutas son cápsulas inicialmente verde pero volviéndose a café oscuro o negro en el futuro. Las cápsulas de los frutos son de 2.5 a 4 cm de largo por 2 cm de ancho, elipsoidales y lisas que cuando maduran van cambiando a amarillas. Al inicio son

carnosas pero dehiscentes cuando son secas. Se producen los frutos en invierno cuando el arbusto bota sus hojas, puede producir varias cosechas durante el año si la humedad de la tierra es buena y las temperaturas son suficientemente altas. Cada inflorescencia produce aproximadamente 10 frutos ovoides o más. El desarrollo del fruto necesita 90 días desde la floración hasta que madura la semilla (Heller, 1996; Miller, 1962).

Polen. Esférico, radical, con un diámetro de 77 μm , sin aberturas, la superficie redondeada verrucosa. Número cromosómico: $n=11$; $2n=22$ (Miller, 1962).

Semilla: La fruta produce tres almendras negras, cada una aproximadamente de 2 cm de largo y 1 cm de diámetro. La semilla es cosechada cuando la cápsula está madura y esta cambia del verde a amarillo, ocurre después de dos a cuatro meses de la fertilización. Las semillas descascaradas negruzcas, delgadas se parecen a las semillas del ricino pequeño. El volumen de aceite es 35-40% en las semillas y 50-60% en el grano.

Ecotipos

Las especies de la familia Euphorbiaceae, se caracterizan generalmente por producir fitotoxinas, por lo que es posible que algunas de las especies que se distribuyen en su hábitat sean tóxicos para animales y humanos (Brittaine y Lutaladio, 2010; Becker *et al.*, 2008). Aunque las semillas de *J. curcas* cuentan con sustancias antinutricionales, que se degradan al exponerlos a altas temperaturas, por lo que solo se considera la presencia de los esteroides de forbol, como principal sustancia tóxica

presente, esta sustancia causa principalmente dolor de estómago, diarrea, vomito, irritación en la piel (Martínez *et al.*, 2010). De acuerdo con Schmook y Sánchez (2000) las procedencias tóxicas, que son capaces de causar síntomas de envenenamiento, pueden contener cantidades de esteres de forbol de $2.17 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ o más. Mientras las procedencias no tóxicas, que no representan riesgos al ser consumidas después de tostarse o cocerse, poseen cantidades muy limitadas de esta sustancia de $0.11 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ o menos. Para Martínez *et al.* (2010) los contenidos de esteres de forbol de las semillas consideradas tóxicas varían entre $0.6 - 4.05 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$, y se encuentran ausentes o no son detectados en las semillas consideradas como no tóxicas.

Condiciones ambientales

J. curcas, es una especie de origen tropical y subtropical, por lo que se adapta a condiciones de sequía y lluvioso, ya que en apocas de baja humedad pierde las hojas para sobrevivir, por lo que también se puede establecer en condiciones áridas y semiáridas, aunque es poco tolerante a condiciones de temperaturas bajo cero e inundación (Sánchez, 2010; Heller, 1996; Brittain y Litaladio, 2010). Aunque se han reportado establecimientos en condiciones de baja humedad (250 – 300 mm al año), pero sin productividad (Jongschaap *et al.*, 2007), ya que para tener producción se encuentra en humedad de 1000 y 1500 mm anualmente. En condiciones de alta humedad y lluvia, tiene gran susceptibilidad a ataques de enfermedades fungosas (Ouwens *et al.*, 2007).

Problemas fitosanitarios

Generalmente reportan a *J. curcas* como una planta libre de plagas y enfermedades, o con poca susceptibilidad de ser atacado, debido a sus características tóxicas en diferentes partes de la planta, como hojas, semillas, frutos, etc. En observaciones de diferentes puntos, en donde se encuentra esta especie de forma libre o silvestre, los reportes pueden afirmarse, pero en condiciones de monocultivo la presencia de problemas de hongos y plagas, los daños son significativas económicamente. Bajo estas condiciones de cultivo se ha observado la presencia de enfermedades como pudrición de cuello, pudrición de hojas, pudrición de raíz por damping-off, entre otros problemas en flores y frutos (FAO, 2010).

También se reportan la presencia de virus (African cassava mosaic virus), aunque no directamente en la especie de *J. curcas*, pero si en una especie del género, *J. multifida*, por lo que es recomendable no asociar estas especies, que puede ser una fuente de infección (Achten *et al.*, 2008).

En el Cuadro 1 se listan las especies de patógenos que han sido reportadas dañando a *J. curcas*.

Cuadro 1. Agente causal, daño y fuente, de problemas fitosanitarios en *J. curcas*.

Agente causal	Daños	Fuente
<i>Phytophthora</i> spp.	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Heller, 1992
<i>Phytium</i> spp.	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Heller, 1992
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición de raíz y tallo de plántulas	Heller, 1992;CABI 2005
<i>Helmintosporium tetrameta</i>	Manchas en hojas	Singh, 1983
<i>Cochliobolus spicifer</i>	Daño en hojas	CABI, 2005
<i>Pestalotiopsis paraguensis</i>	Manchas en hojas	Singh, 1983; Kar y Das, 1987
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	Manchas en hojas	Singh, 1983
<i>Cercospora jatrophae-curcas</i>	Manchas en hojas	Heller, 2002, CABI, 2005
<i>Clitocybe tabescens</i>	Pudrición de raíz	Behl, 2009
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Manchas en hojas	Behl, 2009
<i>Phakopsora jatrophaicola</i>	Roya en hojas	Behl, 2009
<i>Capnodium</i> spp.	Cubre el follaje evitando que realice fotosíntesis	Orihuela y Bocanegra, 2009
<i>Elsinoe brasilinesis</i>	Causa elongación en la planta	Behl, 2009
<i>Xantomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	Se puede encontrar en toda la planta, manchas negras en hojas y frutos	CABI, 2005

Enfermedades

Gran cantidad de especies fungosas causan enfermedades a las plantas, tanto cultivados como silvestres. En las plantas de interés agrícola, causa una reducción en la producción, reduciendo el rendimiento, calidad del producto, limitando el tiempo de disponibilidad de los alimentos y materias primas a las industrias (Agris, 2005). Los hongos pueden ser parásitos obligados o no obligados, en el primer caso el control es relativamente fácil controlar al suspender el cultivo de las plantas hospedadoras, mientras que los biotróficos es más difícil ya que se pueden reproducir aun en materia orgánica

en descomposición (Agrios, 2005; Kavanagh, 2011). La manifestación de las enfermedades en las plantas puede ser de diferentes maneras y síntomas como amarillamiento, cancro, marchitamiento, etc. (Kavanagh, 2011).

La presencia de determinados hongos fitopatógenas, puede ser un limitante o condicionante para la implementación de ciertas especies agrícolas (caso *Jatropha curcas*), con interés económicos (Cuevas, 2012, comunicación personal).

Algunos géneros de hongos causantes de enfermedades en plantas *Fusarium* spp., *Verticillium* sp., *Phytophthora* sp., *Ceratocystis* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Botrytis* sp., *Pythium* sp., *Rhizopus* sp., *Monilia* sp., *Colletotrichum* sp., *Mycosphaerella* sp., *Venturia* sp., *Puccinia* sp., *Hemileia* sp., *Ustilago* sp., *Tilletia* sp., *Erysiphae* sp., *Plasmodiophora* sp., (Kavanagh, 2011).

Algunas de las enfermedades que ataca a *J. curcas* son:

Cenicilla (*Oidium hevea*). Es un patógeno que se presenta en las hojas, pudiendo causar defoliación y caída de frutos. Generalmente ocurre durante la estación seca (Andrade y Gabriel, 2008).

Gomosis (*Phytophthora* sp.). Este patógeno se presenta en la base del tallo, con una pudrición blanda, despidiendo un líquido oscuro, del mismo color que las partes afectadas. A causa del ataque, se aprecia marchitez, amarillamiento y caída de hojas, progresando hasta la muerte de la planta (Andrade y Gabriel, 2008).

Pytium (*Pytium aphanidermatum*). Este hongo ataca a plántulas pequeñas, principalmente en semillero. También afecta la germinación y emergencia, bajando

hasta 65%. Ya que afecta directamente al embrión al inicio de crecimiento (Valdés, 2012). Para aumentar la supervivencia de plántulas durante la germinación es importante establecer el semillero en suelo arenoso (Ouwens *et al.*, 2007; Valdés, 2012), ya que en suelo con buen drenaje el desarrollo del hongo es mínima (Romero, 1988).

En plántulas ya emergidas e infectadas con este patógeno durante la germinación, solo sobreviven el 20%, ya que los daños en las raíces hacen imposible su desarrollo, mientras que la estructuras del hongo crecen más rápido (Valdés, 2012).

Roya (*Phakopsora jatrophiicola*). Cuando se presenta, se establece directamente en las hojas, formando pustulas, lo que reduce la superficie fotosintética de la planta, en ataque mucho más fuertes provoca una defoliación completa de la planta (Andrade y Gabriel, 2008).

Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*). El ataque de estos hongos es similar, causas manchas en las hojas de 0.2 a 0.5 cm, y que pueden incrementarse hasta la muerte de la hoja completa. En los frutos también aparecen manchas característicos de color marrón (Andrade y Gabriel, 2008).

Alternaria (*Alternaria* spp.). Es causante de caída de hojas de forma prematura, empezando los daños por una mancha (Andrade y Gabriel, 2008).

Mancha de Passalora (*Passalora ajrekari*). Es un patógeno que se presenta en las hojas, causando lesiones de forma redonda de 1.0 a 2.0 cm de diámetro, color marrón claro, cremoso, con una delgada línea del mismo color más oscura (Andrade y Gabriel, 2008; Crous y Braun, 2003).

Pudrición (*Lasiodiplodia theobromae*). Se presenta en los tallos, presentándose como inicio de la infección en estructuras secas, y puede evolucionar en el tallo y causar la muerte (Andrade y Gabriel, 2008), esta enfermedad se ha observado en diferentes regiones del mundo, aparte de Brasil (Freire *et al.*, 2004).

Hongos fitopatógenos en el suelo

Los hongos son dominantes de todo tipo de suelos y representan la gran parte de la biodiversidad del suelo. Poseen micelio filamentosos compuestos por hifas individuales, pudiendo ser uni, bi o multinucleadas, así como, septadas o no septadas (Hawksworth, 1991b).

Diferentes factores son necesarios para la presencia de los diferentes microorganismos en el suelo (Hawksworth, 1991a, b). Sin embargo, la cantidad y calidad de la materia orgánica existente influye en el número de hongos ya que estos son heterótrofos.

Los géneros comúnmente encontrados en el suelo son *Acrostalagmus*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pillularia*, *Cylindrocarpon* y *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Pythium*, *Chaetomium*, y *Rhizoctonia* (Newman, 1985; Hawksworth, 1991a; Subba, 1997, citado por Buscot y Varma, 2005).

LITERATURA CITADA

- Achten, W.M.J.**, Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R. & Muys, B. (2008). *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, 32: 1063–1084.
- Agrios, G. N.** (2005). *Plant pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic press. London. UK. 922 p.
- Andrade, S. F. D.;** Gabriel, D. (2008). Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. *Biológico*, São Paulo, 70(2), 63-64.
- Bautista, R. E.** (2007). Contribución al Estudio Etnobotánico del Piñón (*Jatropha curcas* L.) y Alternativas para la Conservación de su Plasma Germinal. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo. 126p.
- Booth, C.** 1971. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19-31.
- Brittaine, R.;** Litaladio, L. (2010). *Jatropha: A smallholder bioenergy crop. The potential for Pro-poor Development*. Integrated Crop Management. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 96 p.
- Buscot, F.;** Varma, A. (2005). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Ed. Springer. Heidelberg. Alemania. 419p.
- CAB Internacional.** (2000). *Crop Protection Compendium*. CD 2nd edition. Wallingford U. K. CAB International.

- Crous, P.;** Braun, U. (2003). *Mycosphaerella* and its anmorphs: 1 Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Utrecht. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 571p.
- FAO.** (2010). *Jatropha: A Smallholder Bioenergy Crop. The Potential for Pro-Poor Development. Integrated Crop Management.* Rome. Italy. 8.
- Freire, F. das C. O.;** Viana, F. M. P.; Cardoso, J. E.; Santos, A. A. (2004). Novos Hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindustria Tropical. 6p. (Embrapa Agroindustria Tropical. Comunicado Técnico, 91).
- Hawksworth, D. L.** (1991a). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture. CAB International/Redwood Press, Melksham, UK, 302p.
- Hawksworth, D. L.** (1991b). The fungal dimension of diversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 95:641–655
- Heller, J.** (1996). “Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops” 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Henning, R. K.** (2002). Using the indigenous knowledge of *Jatropha* – The use of *Jatropha curcas* oil as raw material and fuel. Washington DC: IK Notes, The World Bank; (47).
- Jongschaap R., E. E.;** Corré, W. J.; Bindraban, P. S.; Brandenburg W. A. (2007). Claims and Factson *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* Evaluation,

Breeding and Propagation Programme. Plant Research International. Report 158. Wageningen. UR. Consulta: Dic. 22, 2008. Disponible en: http://www.factfuels.org/en/FACT_Knowledge_Centre/FACT_Publications.

Kavanagh, K. (2011). Fungi: Biology and applications. Ed. Wiley-Blackwell. Second Edition. Oxford, UK. 366p.

Kobayasti, L.; Adoriam, A. I.; De Piva Neto, B. V.; Alves, C. Z.; Zuffo, M. C. R. (Jul. 2011). Incidência de fungos em sementes de pinhão-manso. e-ISSN 1983-4063 - www.agro.ufg.br/pat - Pesq. Agropec. Trop., Goiânia. 41(3), 385-390p.

Garcete, L.; Orrego, A.; Rodriguez, H. (Nov. 2009). Primeros reportes de patógenos de *Jatropha curcas* en Paraguay en cultivos implantados. I Congreso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão Manso. Brasília-DF.

Verastegui, L.; García, L., (2001). Determinación de Metabolitos secundarios a partir de una cepa Nativa de *Aspergillus* sp. aislada del Paramo del Tablazo, Departamento de Cundinamarca. Microbiologo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias . Bogotá D.C. 72p.

Goldfarb, M.; Martins, D. M. E.; Cavalcanti, M. M. E.; Cordeiro, N. L.; Maria, S. F. (2010). Incidência de fungos e qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) após o armazenamento criogénico. Biotemas, 23(1): 19-26. ISSN 0103 – 1643.

Gour, V. K. (2006). Production practices including post harvest management of *Jatropha curcas*. In: Singh, B.; Swaminathan, R.; Ponraj, V. (Eds.). *Biodiesel conference towards energy independence: focus on Jatropha*. New Delhi: Rashtrapati Bhawan. 223-251p.

- Martínez H., J.** (2004). “El piñón (*Jatropha curcas*) una planta nativa de México con potencial alimentario y agroindustrial”. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. IPN. (www.ipn.mx).
- Martínez, H. J.** (2006). El piñón (*Jatropha curcas*) una planta nativa de México con potencial alimentario y agroindustrial. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. IPN.
- Martínez, H. J.,** Martínez, A. A. L., Makkar, H., Francis, G., and Becker, K. (2010). Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Eur. J. Sci. Res. 39: 396–407p.
- Makkar, H.P.S.;** K. Becker, F. Spurer and M. Wink. (1997). Studies on nutritive potencial and toxic constituents of different provence of *Jatropha curcas*. Journal Agriculture Food Chemistry 45: 3152-3127p.
- Miller K. I.,** Grady L., y Webster L. (1962). “Systematic position of *Cnidocolus* and *Jatropha*”. Brittonia (14): 174-180p.
- Newman E., I.** (1985) The Rhizosphere: carbon sources and microbial populations. In: Fitter AH, AtkinsonD, Read DJ, Usher MB (eds) Ecological interactions in soil, plants, microbes and animals. Blackwell, Oxford. 107–121p.
- Ouwens K. D.,** Francis G., Franken Y. J., Rijssenbeek W., Riedacker A., Foidl N., Jongschaap R., Bindraban P. (2007). Position Paper on *Jatropha curcas*. State of the Art, Small and Large Scale Project Development. Fuels from Agriculture in Communal Technology (FACT). Consulta: Septiembre 17 del 2008. Disponible en: www.factfuels.org/media_en/Position_Paper_on_Jatropha_Curcas.

- Reyes Q., C. K.** (2003). Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo empleando *Jatropha curcas* L., una planta productora de biodiesel. Colegio de Posgraduados. México.
- Romero, C. S.** (1988). Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347p.
- Sandoval, I.;** López, M. (1990). Nuevos hiperparásitos de la roya de la caña de azúcar *Puccinia melanocephala* H. y P. Syd. ATAC. 49 (2): 20-26p.
- Sandoval, I.** (2001). La roya de la caña de azúcar en Cuba. La Habana: Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. 107p.
- Santiago, E. E.** (2011). Dinamica de comunidades de colembolos edaficos en un Bosque de encinos en Tequexquinahuac, Texcoco, Mexico. Tesis Profesional. Departamento De Parasitologia, UACH. Mexico.
- Sharma, S.;** Kaushik, J. C.; Kaushik, N. (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*. Indian Phytopathology, New Delhi. 54, (2), 275p.
- Subba R., N. S.** (1997). Soil microbiology. IBH Publ, Oxford.
- Toral, O. C.;** Iglesias, J.M.; Montes, de O. S.; Sotolongo, J.A.; García, S.; Torst, M. (2008). *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. Pastos y Forrajes. 31(3), 191-207p.
- Valdes R., O. A.;** Garcia E., R.; Sanchez S., O. Perez V., A. (2011). Solation and pathogenicity of a possible *Pythium aphanidermatum* in *Jatropha Curcas* L. non toxic. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14, 649 – 660p.

- Valdés, R. O. A.** (2012). Estudio de *Jatropha curcas* L. no tóxica: semillas, plántulas y primeros estadios del sistema de raíces. Tesis de Doctorado. Universidad Veracruzana. Centro de investigaciones Tropicales. Veracruz, México. 116p.
- Ward, O. P.;** Qin, W.M; Dhanjoon, J.; Ye, J.; and Singh, A. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY, 58. Elsevier Inc. Department of Biology, University of Waterloo Waterloo, Ontario, Canada.
- Webster J.** (1986). Introduction to Fungi. 2º ed. Cambridge University Press.
- Worang, R. L.;** Setyawati, D. O.; Syarief, R.; Miftahudin. (2008). The quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Seeds packed in plastic material during storage. Biotropia. 15(1).

CAPITULO 1

DIVERSIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. COLECTADAS EN LOS ESTADOS DE PUEBLA, VERACRUZ Y CHIAPAS FUNGAL DIVERSITY ASSOCIATED TO *Jatropha curcas* L. SEEDS COLECTED IN THE STATES OF PUEBLA, VERACRUZ Y CHIAPAS

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de hongos asociados a las semillas de *J. curcas* colectadas en los estados de Puebla, Veracruz y Chiapas durante los años 2008, 2009, 2010 y 2012. Durante el 2012, se aislaron los hongos asociados a las semillas mediante la técnica de papel secante. Los hongos aislados se identificaron mediante caracterización morfológica de sus estructuras de reproducción y de las colonias desarrolladas en medio de cultivo. Los hongos asociados a la semilla fueron: *Fusarium* spp., *Colletotrichum gleosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Gliocladium* sp. y *Chaetomium* sp.

Palabras clave: *Jatropha curcas*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Alternaria* semillas.

ABSTRACT

The objective of this study was to determinate the fungal diversity associated to *J. curcas* seeds collected in the states of Puebla, Veracruz and Chiapas during the years 2008, 2009, 2010 and 2012. In 2012, fungi associated to seeds were isolated using the blotter test. The fungal species isolated were identified by morphological characterization of reproductive structures and colonies grown on culture medium. The fungal species associated were: *Fusarium* spp., *Colletotrichum gleosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Gliocladium* sp. y *Chaetomium* sp.

Key words: *Jatropha curcas*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Alternaria* semillas.

INTRODUCCIÓN

Las semillas de *J. curcas*, a pesar de que se encuentran cubiertas de una testa dura y densa (Saturnino *et al.*, 2005), casi impenetrable por el agua, pueden ser fácilmente infectados por diferentes tipos de hongos, principalmente por su contenido de proteínas (Jayaraman *et al.*, 2011). Generalmente durante la cosecha de las semillas se generan daños físicos por el contacto con otros frutos, o por daños causados por insectos, los cuales ocasionan que las semillas se contaminen con algunos patógenos que pueden afectar durante el almacenamiento, o adherirse otros hongos de potencial patogénico.

La resistencia de *J. curcas* a las enfermedades se consideraba como poco susceptible, e incluso resistente. Sin embargo, por la incidencia de enfermedades que se han observado en las plantaciones, principalmente en plantas bajo estrés, esta característica poco a poco se ha retirado (Pereira, *et al.*, 2009). En plantaciones comerciales, y principalmente bajo estrés, se pueden observar los efectos inmediatos y negativos que pueden ocasionar diferentes patógenos en cuanto se presenta.

Enfermedades como *Lasiodiplodia theobromae* (Pereira *et al.*, 2009), *Fusarium* spp, *Clloetotrichum gleosporioides*, *Cladosporium* sp., *Phakopsora arthuriana* (Garcete *et al.*, 2009), *Botryosphaeria dothidea* (Srinivasa *et al.*, 2011), pueden causar graves daños en una plantación comercial, esta condición se debe a que en estas plantaciones se carece de diversidad de especies, por lo que se pierde el equilibrio biótico (Cuevas, 2010, Comunicación personal).

Por ello para este trabajo se planteó como objetivo identificar algunos de los hongos que pueden ser transmitidos por semillas, los cuales se pueden mantener activos durante el almacenamiento y disminuir la viabilidad de la semilla, así como las especies fungosas potencialmente patógenas al momento de germinar y que puedan afectar la calidad de las plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de semillas

Las colecciones de semillas que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de 10 diferentes sitios, los cuales se distribuyen en los estados de Puebla, Veracruz y Chiapas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Relación de colectas de *J. curcas* que se utilizaron para la identificación de hongos asociados a las semillas.

Colección	Lugar	Año de colecta	Proporcionadas por
Chicuasen 1100	Xochitlan, Puebla	2010	Sra. Lucia
Chicuasen 1100	Xochitlan, Puebla	2012	Sr. Vicente
Zaca 1020	Xochitlan, Puebla	2010	BANGEV
Zaca 1020	Xochitlan, Puebla	2012	Sr. Ernesto
BAZ-CAZ01	Cazones, Veracruz	2010	BANGEV
Cazones	Cazones, Veracruz	2012	Dr. Ubaldo
Totonacapan 019	Tuzamapan, Puebla	2009	BANGEV
Chiapas 02	Chiapas	2008	BANGEV
Chiapas 005	Chiapas	2008	BANGEV
Totonacapan 031	Tetelilla, Puebla	2009	BANGEV

Aislamiento de hongos

Para la inducción del crecimiento micelial y esporulación de los hongos presentes en las semillas de *J. curcas*, estas se lavaron con abundante agua, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 4 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Una vez lavadas, las semillas se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron en una cámara húmeda. Las semillas se dejaron en la cámara húmeda durante tres días, bajo condiciones de temperatura de 30 ± 2 °C y con luz blanca continua.

Pasados los tres días, los crecimientos miceliales de los hongos presentes sobre la semilla se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). En cada caja Petri se colocó un tipo de crecimiento para su posterior observación e identificación, así como las pruebas de patogenicidad. Este procedimiento se llevó a cabo para cada una de las colectas de semillas analizadas.

Purificación y conservación de hongos

La purificación de los aislados se realizó mediante la técnica de cultivos monospóricos. Para evitar el crecimiento de bacterias, los aislados se transfirieron a medio de cultivo Agua-Agar (AA) + ácido láctico (6 gotas L⁻¹).

Una vez que se purificaron los aislados fúngicos, estos se conservaron en glicerina al 20 %, dentro de tubos criogénicos. Los tubos se colocaron a -80 °C para su buena conservación.

Identificación de hongos

Para la identificación cultural se realizaron observaciones para cada colonia creciendo en medio de cultivo PDA de acuerdo a la forma del crecimiento, coloración, y presencia de estructuras reproductivas (Lezcano *et al.*, 2010).

Para la caracterización morfológica, se realizaron preparaciones de las estructuras de reproducción en glicerina y lactofenol, las cuales se analizaron en un microscopio compuesto a 40X. Se registró la medida y forma de cada estructura observada.

La identificación de los hongos a nivel de género se realizó con las claves especializadas de Barnett y Hunter (2006), mientras que la identificación de la especie se llevó a cabo usando las descripciones y claves de Sutton (1980), Leslie y Summerell, (2006), Simmons (2007).

Frecuencia de hongos

Por cada muestra se tomaron 80 semillas al azar, las cuales se dividieron en dos partes para su procesamiento, la primera parte (40 semillas) se desinfectó con hipoclorito de sodio, mientras que la segunda parte (40 semillas) se procesó sin desinfectar.

Se calculó la frecuencia de cada patógeno desarrollado en cada muestra, contando los crecimientos en cada semilla. Para diferenciar a cada especie de patógeno se realizaron aislamientos en PDA, para observar su desarrollo e identificación.

Pruebas de patogenicidad

Una vez teniendo purificados e identificados cada uno de los aislados fungosos, se procedió a realizar la pruebas de patogenicidad. La verificación de la patogenicidad únicamente se realizó para los hongos aislados que presentan potencial patogénico en plantas, tales como *Fusarium* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium* sp., *Lasiodiplodia theobromae*. y *Phomopsis* sp.

Se utilizaron plantas de *J. curcas* obtenidas a partir de semillas. Las plántulas, contaban con cinco meses de edad y una altura de 15 cm. Desde la germinación, las plántulas no mostraron ningún síntoma de enfermedades, ni daños en las raíces, por lo que se consideraron como sanas y adecuadas para las pruebas de patogenicidad.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron bajo condiciones de invernadero, en suelo estéril (Peat moss[®] + tezontle), en donde se establecieron las condiciones adecuadas para el desarrollo de las plántulas. Para favorecer el desarrollo de los hongos, se colocó un humidificador para elevar la humedad de 60 a 85 %. La temperatura en el invernadero fue de 25 ± 2 °C en la noche y de 30 ± 2 °C durante el día.

La inoculación consistió en aplicar 10 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} del hongo potencialmente patogénico a cada plántula. La suspensión preparada con el inóculo se colocó en la base del tallo de la plántula, tratando de que la suspensión llegara hasta las raíces. Para el caso de *Colletotrichum gleosporioides*, la suspensión se depositó en las hojas superiores, mientras que la suspensión de conidios de *Fusarium* spp. se aplicó en la raíz. Para las especies de *Lasiodiplodia theobromae* y *Phomopsis* sp., la suspensión de fragmentos miceliales se inoculó en cuello y raíz. Para cada tratamiento se establecieron 5 repeticiones. Cinco plantas que únicamente fueron asperjadas con agua destilada sirvieron como testigo. Una vez inoculadas las plántulas, se mantuvieron las condiciones de humedad relativa, temperatura y riego periódicamente, durante 40 días. La observación y el registro de síntomas se llevo a cabo cada tercer día. Posterior al día 50, todas las plántulas inoculadas mostraron síntomas iniciales, por lo que se procedió al re-aislamiento de los hongos en laboratorio siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad de semilla

En las colecciones analizadas se encontró que todas las muestras estaban contaminadas con algunas especies de hongos, ya sea patógeno, saprofito o de almacén. En el Cuadro 3 se presenta el porcentaje de semillas que desarrollaron alguna o varias especies de hongos durante el experimento, tratadas con cloro y sin tratamiento. El porcentaje de crecimientos en semillas sin tratamiento va de 62

a 95 %, mientras que, en semillas tratadas se observó de 32 a 90 % de frecuencia de hongos. En promedio, el porcentaje de disminución de semillas con crecimientos fungosos, después de tratamiento con cloro fue de 25 %, por lo que es importante dar algún tratamiento a las semillas previo a su germinación (Goldfarb *et al.*, 2009), aun cuando estas no se hayan mantenido en almacenamiento, ya que la presencia de especies fúngicas disminuye el porcentaje de viabilidad (Toba *et al.*, 2011) y calidad de plántulas (Vanzolini *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Porcentaje de semillas con crecimiento fungoso, bajo tratamiento con cloro y sin tratamientos, para cada colección.

Colecta	Semillas enfermas (%)	
	Sin cloro	Con cloro
Chicuasen 1100_1	70.0	47.5
Chicuasen 1100_2	92.5	37.5
Zaca 1020_1	85.0	45.0
Zaca 1020_2	62.5	32.5
Baz caz 02	62.5	50.0
Cazones 1	62.5	37.5
Totnacapan 19	95.0	90.0
Chiapas 02	95.0	85.0
Chiapas 005	90.0	75.0
Totnacapan 031	82.5	42.5

En la Figura 1, se observan las diferencias en porcentajes de semillas con crecimientos fungosos en ambos tratamientos (con y sin tratamiento con hipoclorito de sodio). Las colecciones provenientes de “Totonacapan”, Puebla y Chiapas, fueron colectadas en 2008 y 2009, y se mantuvieron en almacenamiento con baja temperatura ($-16\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), los cuales mostraron mayor incidencia de hongos aun después de haber sido desinfestadas, además de que disminuyó por igual el porcentaje de germinación (Vanzolini *et al.*, 2010) y viabilidad, por efecto de la humedad y de los hongos (Setyawati *et al.*, 2009).

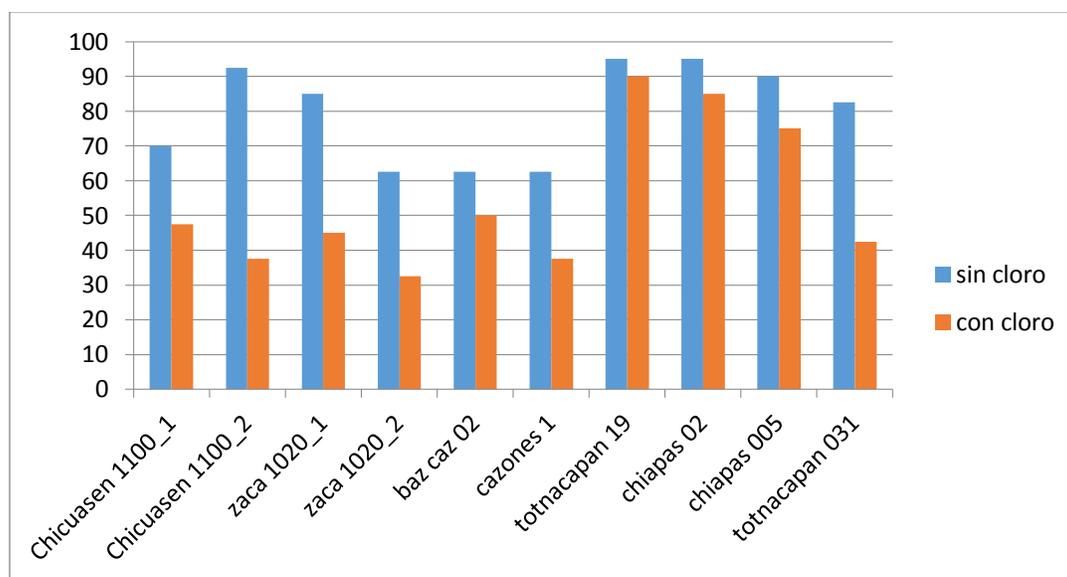


Figura 1. Porcentajes de semillas con crecimiento fungoso, para cada colección, y de acuerdo a cada tratamiento (desinfestadas y no desinfestadas).

Setyawati *et al.* (2009), reportaron que diferentes especies de hongos son resistentes a bajas temperaturas en almacenamiento de semillas de *J. curcas*, por lo que pueden ser una forma de dispersión de diferentes tipos de patógenos,

además de que hongos de almacén pueden incrementarse y seguir deteriorando las semillas (Jayaraman *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2012), lo que concuerda con las observaciones realizadas en el presente trabajo.

Hongos aislados de semillas

De las semillas procesadas se aislaron 10 especies fungosas (Cuadro 4), entre los que destacan *Fusarium* spp. (Vanzolini *et al.*, 2010), *Aspergillus flavus* y *A. niger* (Jayaraman *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2012), las cuales se encontraron en todas las colecciones.

Colletotrichum gleosporioides se aisló en nueve colecciones, *Cladosporium* sp. se encontró en siete (Goldfarb *et al.*, 2009), mientras que *Lasiodiplodia theobromae* solo se encontró en dos colecciones, aunque es una de las enfermedades que pueden causar daño de mayor importancia económica, ya que los daños inician en el cuello de la planta (Latha *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Cuadro 4. Frecuencia de hongos asociados a la semilla de diferentes colecciones de *J. curcas*.

Colección	Origen	Genero o especie	Semillas (%)	
			No Desinfestadas	Desinfestadas
Chicuasen 1100	Xochitlan, Puebla	<i>Fusarium</i> spp.	50.0	40.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	37.5	5.0
		<i>Aspergillus niger</i>	15.0	0.0
		<i>C. gloeosporioides</i>	27.5	15.0
		<i>Chaetomiun</i> sp.	0.0	37.5
		<i>Cladosporium</i> sp.	10.0	0.0
Chicuasen 1100	Xochitlan, Puebla	<i>Fusarium</i> spp.	37.5	37.5
		<i>Cladosporium</i> sp.	15.0	5.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	50.0	75.0
		<i>Aspergillus niger</i>	50.0	10.0
		<i>C. gloeosporioides</i>	97.5	15.0
		<i>Chaetomiun</i> sp.	75.0	12.5
		<i>Pennicillium</i> sp.	50.0	20.0
Zaca 1020	Xochitlan , Puebla	<i>Fusarium</i> spp.	17.5	5.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	0.0	17.5
		<i>Aspergillus niger</i>	0.0	22.5
		<i>C. gloeosporioides</i>	27.5	30.0
		<i>Chaetomiun</i> sp.	20.0	20.0
		<i>Cladosporium</i> sp.	17.5	15.0
Zaca 1020	Xochitlan, Puebla	<i>Fusarium</i> spp.	62.5	30.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	47.5	7.5
		<i>Aspergillus niger</i>	0.0	7.5
		<i>C. gloeosporioides</i>	50.0	0.0
		<i>Chaetomiun</i> sp.	47.5	20
BAZ-CAZ01	Cazones, Veracruz	<i>Fusarium</i> spp.	95	0.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	42.5	0.0
		<i>Aspergillus niger</i>	0.00	22.5
		<i>L. theobromae</i>	57.5	20.0
		<i>Fusarium</i> spp.	47.5	22.5
		<i>L. theobromae</i>	22.5	30.0
Cazones	Cazones, Veracruz	<i>Phomopsis</i> sp.	15.0	32.5
		<i>Aspergillus flavus</i>	5.0	42.5
		<i>Aspergillus niger</i>	42.5	0.0
		<i>C. gloeosporioides</i>	67.5	0.0
		<i>Cladosporium</i> sp.	47.5	45.0
		<i>Curvularia</i> sp.	17.5	27.5

		<i>Penicillium</i> sp.	25.0	17.5
		<i>Fusarium</i> spp.	77.5	22.5
Chiapas 02	Chiapas	<i>Aspergillus flavus</i>	75.0	10.0
		<i>Aspergillus niger</i>	67.5	47.5
		<i>C. gloeosporioides</i>	77.5	40.0
		<i>Cladosporium</i> sp.	0.0	77.5
		<i>Fusarium</i> spp.	60.0	12.5
Chiapas 005	Chiapas	<i>Cladosporium</i> sp.	15.0	95.0
		<i>Aspergillus flavus</i>	0.0	35.0
		<i>Aspergillus niger</i>	0.0	32.5
		<i>C. gloeosporioides</i>	47.5	57.5
		<i>Fusarium</i> spp.	92.5	92.5
Totonacapan 019	Tuzamapan, Puebla	<i>Aspergillus flavus</i>	47.5	32.5
		<i>Aspergillus niger</i>	15.0	5.0
		<i>C. gloeosporioides</i>	0.0	32.5
		<i>Chaetomiium</i> sp.	75.0	55.0
		<i>Cladosporium</i> sp.	0.0	12.5
		<i>Fusarium</i> spp.	47.5	32.5
Totonacapan 031	Tetelilla, Puebla	<i>Aspergillus flavus</i>	75.0	37.5
		<i>Aspergillus niger</i>	50.0	47.5
		<i>C. gloeosporioides</i>	20.0	12.5

A continuación se mencionan algunas de los hongos aislados y su importancia:

Fusarium spp. se encontró en todas las colecciones procesadas, invadiendo del 17 a 95 % de las semillas de las diferentes colecciones. Vanzolini *et al.* (2010) y Kobayasti *et al.* (2009), reportaron la presencia de esta especie durante la germinación en semillas desinfectadas. Aun en las semillas que se han mantenido en almacenamiento durante 3 o 4 años a baja temperatura y humedad (Kobayasti *et al.*, 2009; Vanzolini *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011), como en el caso de las colecciones provenientes de Chiapas y Totonacapan. Este patógeno debe ser considerado en la prevención de enfermedades al momento de germinar las

semillas, ya que se ha reportado asociado a pudrición de raíces y tallos (Sharma *et al.*, 2001; Gour, 2006).

Fusarium spp., se desarrolla muy bien bajo condiciones de 25 °C, y 24 h de oscuridad y 12 h de luz en medio PDA, lo cual es indispensable para su identificación en laboratorio (Kausar *et al.*, 2009). Melo *et al.*, (2007), reportan la presencia de *Fusarium spp.* en gran incidencia bajo este método, principalmente en semillas no desinfectadas y con testa (Correa *et al.*, 2011), lo que coincidió con los resultados obtenidos en este trabajo.

Cladosporium sp. se presentó en 7 colecciones (“Chicuasen 1100_1 y 2”, “Zaca1020_1 y 2”, “Cazones2” y “Chiapas02 y 005”), por lo que su distribución es abundante, considerándose como un patógeno resistente hasta en el almacenamiento (Vanzolini *et al.*, 2010). Kobayasti *et al.* (2011), detectaron a *Cladosporium clasdosporioides* en semillas de frutos secos de *J. curcas* en Brasil, reportando una incidencia de 4.5 a 85 % de las semillas muestreadas, teniendo mayor incidencia en semillas no desinfectadas. La presencia de este hongo puede causar el deterioro de la calidad de las semillas, ya que puede desarrollarse mientras que las semillas se encuentren en almacenamiento (Srivastava *et al.*, 2011).

Dentro de los hongos patógenos, se identificó a *Lasiodiplodia theobromae* (Figura 2), el cual se presentó en las colecciones “Baz-Caz01” y “Cazones2”, ambas obtenidas de Cazones, Veracruz, con una incidencia de 62.5 %, sin cloro y 50 y 37 %, en semillas con cloro, respectivamente. Este hongo patógeno se ha reportado como el agente causal de la pudrición de raíz y cuello en plantas adultas

de *J. curcas*, en Brasil (Pereira *et al.*, 2009) e India (Latha *et al.*, 2009). Además, este organismo es responsable de causar gomosis en *J. podagrica*, en China (Fu *et al.*, 2007). Debido a que este patógeno se ubica en el cuello y sistema radical, se considera como un problema serio en plantaciones comerciales (Pereira *et al.*, 2009).



Figura. 2. (A) Crecimiento micelial de *L. theobromae* en semilla de *J. curcas* en cámara húmeda. (B) Colonia de *L. theobromae* cultivada en medio de cultivo PDA. (C) Conidio en desarrollo de *Lasiodiplodia theobromae*.

Colletotrichum gloeosporioides se presentó con una frecuencia que varió entre 40 y 60% en cada colección de semillas (Figura 3), coincidiendo con los resultados obtenidos por Vanzolini *et al.* (2010), al comparar la germinación de semillas de *J. curcas*, desinfectadas y sin desinfectar, en donde obtuvo incidencia

de 35 y 42.5 %, respectivamente. Este patógeno se ha reportado principalmente infectando el follaje, aunque también se ha observado en tallo, ramas y frutos. En infecciones severas, este hongo puede causar caída de flores y posteriormente aborto de frutos. Además, a pesar de ser un parasito facultativo y poder encontrarse en materia en descomposición, también causa daño y en algunas ocasiones si no es controlado puede causar daños considerables (López, 2001). Este hongo se detectó, aun cuando las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, durante 4 min, lo que también coincide con los resultados de Vanzolini *et al.* (2010).



Figura 3. Semillas de *J. curcas* (Colección CAZ 2-2012) con crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* a 5 días después de ser colocadas en cámara húmeda.

En la colección de Cazonas, se detectó a *Phomopsis* sp. teniendo una frecuencia del 20 % con respecto al total de las semillas analizadas, y presentándose solamente en semillas no tratadas con hipoclorito de sodio (Figura 4 A y B). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Kobayashi *et al.* (2011), quienes reportaron una incidencia de *Phomopsis* sp. del 2 % en semillas de frutos maduros no desinfectados.

Generalmente las semillas infectadas por este hongo no germinan (Figura 4), ya que su infección se presentó desde antes que madurara, por lo que la calidad de la semilla fue baja, además de que el hongo puede seguirse desarrollando bajo condiciones más o menos favorables (Dorrance y Mills, 2009).

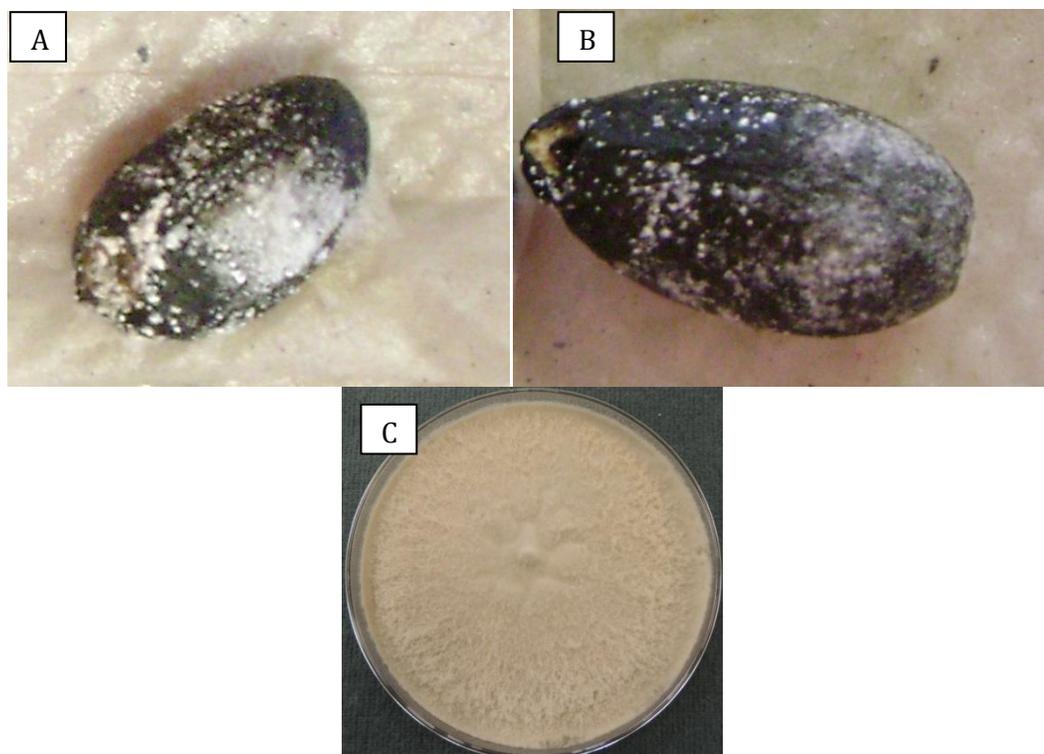


Figura 4. (A, B) Crecimiento micelial de *Phomopsis* sp. en semillas de *J. curcas* colocadas en cámara húmeda. (C) Crecimiento en caja petri sobre medio PDA.

Aspergillus niger y *A. flavus* estuvieron presentes también en todas las colecciones procesadas (Figura 5) coincidiendo con los resultados de Sahad *et al.* (2011) y Jayaraman *et al.* (2011), quienes reportaron incidencias de 90 y 85 % en el total de sus muestras procesadas procedentes de 4 diferentes localidades, y almacenadas de entre 12 y 60 meses. Estos resultados coinciden con los de este trabajo, ya que como se observa en la grafica de la Figura 1, las colecciones que se han mantenido almacenadas durante mayor tiempo, presentaron una mayor incidencia de este hongo (Srivastava *et al.*, 2011; Jayaraman *et al.*, 2011). *Aspergillus* sp., es un hongo que se encuentra en la mayoría de granos

almacenados, principalmente si esta está bajo condiciones que propicien el crecimiento del hongo (temperatura elevada, alta humedad). Kobayasti *et al.* (2009), reportaron la presencia de *Aspergillus* en muestras de semillas provenientes de frutos maduros, con una incidencia de 7 a 15 %, mientras que Melo *et al.* (2007), en Colombia encontraron incidencias de 57 %. Por su parte Jamaraman *et al.* (2011), reportaron la presencia de siete especies de *Aspergillus* en diferentes muestras de semillas, ubicados en la superficie, dentro de la testa y en los cotiledones, las principales especies ubicadas por estos autores fueron *A. niger* y *A. flavus* (Worang *et al.*, 2008), teniendo incidencia hasta de 90 % en la superficie, 75 % en el interior de la semillas y 10% presente en los cotiledones.

La presencia de este género de hongo, incluso puede afectar la calidad del residuo después de la extracción de aceite ya que puede contener micotoxinas, degradación de proteínas, y presencia de otros microorganismos asociados a estos hongos (Jamaraman *et al.*, 2011). Lo anterior plantea un riesgo en el uso del subproducto después de la extracción de aceites. Worang *et al.* (2008), encontraron que diferentes hongos disminuían sus conidios conforme pasaba el tiempo de almacenamiento, mientras que en especies como *A. niger* y *A. flavus*, aumentaban.

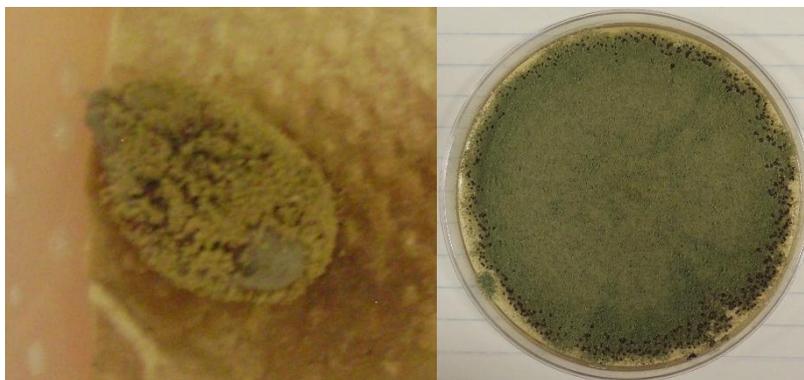


Figura 5. (A) Esporulaci3n de *Aspergillus* spp. en semilla en la c3mara h3meda. (B) Crecimiento en caja Petri, sobre medio PDA.

Penicillium sp. se encontr3 en las colecciones de “Chicuasen 1100_2”, del Estado de Puebla, con incidencia de 50 y 20 % sin y con tratamiento con cloro, respectivamente; y en “Cazones2”, del Estado de Veracruz, con incidencia de 25 y 17 %, sin y con tratamiento de cloro, respectivamente. Aunque este hongo no causa da1o de importancia en pl3ntulas, ya que solamente ataca a granos en almac3n, su importancia es precisamente el efecto en semillas almacenadas que afecta la calidad y disminuye la viabilidad (Srivastava *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2011). Correa *et al.*, (2011), reportaron que este hongo puede transmitirse entre las semillas de un lote a otro, cuando se mezclan las semillas en almac3n, adem3s de que pueden crecer bajo condiciones de baja temperatura, poca humedad y oscuridad (Srivastava *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2011).

De las semillas procesadas se aislaron diferentes especies de hongos fitopat3genos: *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phomopsis* sp. Tambi3n se encontraron hongos que afectan la calidad de las semillas durante su almacenamiento como *Aspergillus* spp.,

Penicillium sp., *Curvularia* sp., *Chaetomium* sp. y *Gliocladium* sp. (Kobayasti *et al.*, 2009). Los primeros mencionados son importantes principalmente en semillas que son destinados para la obtención de plántulas, ya que se activan cuando la semillas se somete a germinación y afectan la calidad de plántula, e incluso llegan a matarla inmediatamente al causar pudrición en raíces y tallo, como es el caso de *Fusarium* spp. y *Lasiodiplodia theobromae* (Kausar *et al.*, 2009).

Chaetomium sp. se encontró en colecciones de “Chacuasen1100_1”, “Chacuasen1100_2”, “Zaca1020_1”, “Zaca1020_2” y “Totonacapan 19”, todas provenientes del Estado de Puebla, con incidencias que fluctuaron entre 12.5 y 55 %, en semillas desinfestadas, mientras que, en semillas sin desinfestar las incidencias fueron de 20 a 75 %.

Curvularia sp. solo se encontró en la colección de “Cazones 2” proveniente del Estado de Veracruz, con incidencia de 17.5 y 27.5 %, en semillas sin cloro y con cloro, respectivamente.

Hongos como *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp. y *Gliocladium* sp, son saprofitos, encontrándose generalmente en materia orgánica en descomposición (Correa *et al.*, 2011). La causa de encontrarlos en las semillas de *J. curcas* puede deberse, a que cuando las semillas son cosechadas se mezclaron con las que habían caído al suelo, debido a que los frutos no maduran al mismo tiempo.

Pruebas de patogenicidad

La mayoría de los hongos inoculados mostraron ser patogénicos, al causar síntomas en las diferentes partes de las plántulas expuestas a estos patógenos.

Fusarium spp. fueron las especies que más daños causaron en las plántulas, principalmente en las raíces, deteniendo la formación de nuevas raíces, así como provocando la muerte de las raíces ya formadas con diámetro menor a 1 mm, mientras que, en raíces con mayor diámetro, causó daños principalmente en el área del cambium, induciendo que los tejidos se tornaran coloridos (puntos rojos a color vino). En el follaje, también se observaron daños, aunque con menor frecuencia, comparado con las raíces. En estas partes, los daños se caracterizaron por presentar una necrosis en el foliolo, y formación de estructuras casi imperceptibles por el crecimiento de hifas.

En relación al género *Fusarium* evaluado en las pruebas de patogenicidad sobre plántulas de *J. curcas*, se identificaron tres especies que se asociaron a este cultivo como hongos patógenos. En primer lugar se encuentra *Fusarium oxysporum*, que ataca principalmente a raíces, deteniendo el crecimiento del sistema radicular y ocasionando necrosis en raíces de mayor diámetro, así como muerte prematura de raíces de reciente formación. Otras especies fueron *Fusarium subglutinans* y *F. verticillioides* (*sin. Fusarium moniliforme*), los cuales se presentaron atacando follaje y tallo, aunque también se encontró en raíz y cuello. Debido a estas características se consideran de importancia fitosanitaria, ya que los daños pueden multiplicarse, dificultando su control. Síntomas similares fueron

observados por Kaushik et al., (2001) por el daño de *Fusarium moniliforme* en *J. curcas*.

Se encontraron daños causados por *Lasiodiplodia theobromae*, principalmente en raíces y cuello, causando la muerte de tejido, empezando por el cambium y corteza. Cuando la enfermedad fue avanzada, los daños se apreciaron en la superficie del tallo a manera de pudrición de cuello, en donde se formaron picnidios semi-inmersos de color negro (Figura 7 A), además de que la planta dejó de crecer y murió lentamente (Figura 7 B). Los resultados coinciden con los descritos por Pereira et al. (2009) en donde mencionan que *Lasiodiplodia theobromae* ocasionó pudrición de tallo en *J. curcas* en Brazil y por Kaushik et. al (2001) donde mencionan que *Botryosphaeria dothidea* L. *teobromae* y *F. moniliforme* ocasionan pudrición y tallo en *J. curcas* en la India . *Lasiodiplodia theobromae* se considera una de las fases asexuales de *B. dothidea*.



Figura 6. Estructuras reproductivas de *Lasiodiplodia theobromae* en el cuello de la plántula y plántulas de *J. curcas* semisecas, dos meses después de la inoculación de fragmentos miceliales.

LITERATURA CITADA

- Andrade, S. F. D.;** Gabriel, D. (2008). Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. *Biológico*, São Paulo. 70(2), 63-64p.
- Alves, C. de Sa D.;** Rodrigues, D. S. G.; Quintao, F. G.; Lemus E. E. A.; Rodrigues, Do N. I. (2011). Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. *Revista Brasileira de Sementes*. 33(4), 663 – 670p.
- Barnett, L.H.;** Hunter, B.B. (2006). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Brittaine, R.;** Lutaladio, L. (2010). *Jatropha: A smallholder bioenergy crop. The potential for Pro-poor Development. Integrated Crop Management*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 96p.
- Correa de SA. D.;** Rodrigues D. S. G; Quintao F. G; Lemus E. E. A.; Rodrigues Do N. I. (2011). Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. *Revista Brasileira de Sementes*. 33(4), 663 – 670p.
- Crous, P.;** Braun, U. (2003). *Mycosphaerella* and its anmorphs: 1 Names
- Dorrance, A.E.;** Mills, D. R. (2009). *Phomopsis Seed Rot of Soybeans*. Department of Plant Pathology. The Ohio State University. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. <http://www.oardc.ohio-state.edu/ohiofieldcropdisease/soybeans/phomopsis.htm>. **AC-36.09**.
- Jayaraman, P.;** NesaPriya, S.; Parameshwari, S.; Shyamala Priya, S.; Jawahar, N.; Sekar Babu, H. (2011). Occurrence of storage fungi in *Jatropha* (*Jatropha*

curcas L.) sedes. African Journal of Microbiology Research 5(5), 475-480p, 4 March, 2011. <http://www.academicjournals.org/ajmr>

Kausar, P.; Chohan, S.; Parveen. (2009). Physiological studies on *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*, the cause of Shesham decline. Mycopath (2009), 7 (1): 35-38.

Kaushik, J. C.; Kaushik, N.; Sharma, S (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of jatropha. Indian Phytopathology. 54(2), 275p. 0367-973X.

Kobayasti, L.; Adoriam, A. I.; De Piva Neto, B. V.; Alves, C. Z.; Zuffo, M. C. R. (Jul. 2011). Incidência de fungos em sementes de pinhão-manso. e-ISSN 1983-4063 - www.agro.ufg.br/pat - Pesq. Agropec. Trop., Goiânia. 41(3), 385-390p.

Fu G, Huang S.L, Wei J.G, Yuan G.Q, Ren J.G, Yan W.H, Cen Z.L. (2007) First record of *Jatropha podagrica* gummosis caused by *Botryodiplodia theobromae* in China. Australasian Plant Disease Notes 2, 75–76p. doi: 10.1071/DN07030.

Gaviria, L. M. G.; Bedoya J. F. S. (2008). Obtención de biodiesel a partir del aceite de la semilla de *Jatropha curcas* L. (Piñón) y evaluación de los parámetros autoecológicos de la planta. Monografía (Graduacao). Universidad de Medellin, Medellin. Colombia. 112p.

Goldfarb, M.; Martins, D. M. E.; Cavalcanti, M. M. E.; Cordeiro, N. L.; Maria, S. F. (2010). Incidência de fungos e qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) após o armazenamento criogénico. Biotemas, 23(1): 19-26p. ISSN 0103 – 1643.

Gour, V. K. (2006). Production practices including post harvest management of *Jatropha curcas*. In: Singh, B.; Swaminathan, R.; Ponraj, V. (Eds.). Biodiesel conference towards energy independence: focus on *Jatropha*. New Delhi: Rashtrapati Bhawan. 223-251p.

Latha, P.; Prakasam, V.; Kamalakannan, A., C. Gopalakrishnan. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot

and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*. www.publish.csiro.au/journals/apdn. Año 2009, 4, 19–20p.

Lezcano, J. C.; Martínez, B.; Alonso, O. (2010). Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*, 33(1), enero-marzo, 2010, 1-14p. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Matanzas, Cuba.

López, A.M.Q. (2001). Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. Revisão. *Anual de Patologia de Plantas - RAPP*, [S.I.], 9, 291-338p.

Melo, M.F.V.; Santos, H.O.; Silva-Mann, R.; Mesquita, J.B. (2007). Fungos asociados a sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura>>.

Makkar, H.P.S.; K. Becker, F. Spurer and M. Wink. (1997). Studies on nutritive potencial and toxic constituents of different provenance of *Jatropha curcas*. *Journal Agriculture Food Chemistry* 45: 3152-3127p.

Pereira, O. L.; Dutra, D. C.; Dias, L. A. S. (2009). *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. www.publish.csiro.au/journals/apdn. Año 2009, 4, 120–123p.

Sahad A. F.; Aly S. E.; Nawar L. S.; El-Faham S. Y. (2011). Fungal occurrence in physic nut (*Jatropha curcas*) seedes during storage and possibility aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates. *Journal of American Science*, 7(5). <http://www.americanscience.org>.

Saturnino, H.; Pacheco, D.; Kakida, J.; Tominaga, N.; Gonçalves, N. (2005). Produção de oleaginosas para biodiesel. *Informe Agropecuario (BR)*. 26(229), 44-78p.

- Setyawati D. O;** Lilly W. R. Syarief R.; Miftahudin. (2009). The Quality of Physic Nut (*Jatropha curcas*) Seeds Affected by Water Activity and Duration of Storage. *Microbiology Indonesia*. 3(3), December 2009.
- Sharma, S.;** Kaushik, J. C.; Kaushik, N. (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*. *Indian Phytopathology*, New Delhi. 54(2), 275p.
- Srinivasa, R. Ch.;** Pavani, K. M.; Wani, P. S.; Marimuthu, S. (2011). Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Current Science*. 100(10). 1547-1549p. May. 2011.
- Srivastava A.;** Sinha A.; Srinastava C.P. (2011). Screening of seed-borne Mycoflora of *Jatropha curcas* L. *Research Jurnal of seed Science*. Doi: 10.3923/rjss.2011.
- Toba A. S;** Ruth O. O.; Adebayo S. E. (2011) Germinability and seedling vigour of physic nut (*Jatropha curcas* L.) sedes inoculated with seed-borne fungi. *African Journal of Agricultural Research*. 6(12), 2655-2659p, 18 June, 2011. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Tiwari P.;** Kannoja P.; Pandey A. (2012). *Jatropha* seed borne fungi in the haryana. *Society for Science and Nature*. 2(1), 83-85p.
- Vanzolini, S.;** Kalil M., E, B.; Alves, da S., R; Nakagawa, J. (2010). Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-mansão. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(4) 009 – 014p.
- Worang, R. L.;** Setyawati, D. O.; Syarief, R.; Miftahudin. (2008). The quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Seeds packed in plastic material during storage. *Biotropia*. 15(1).

CAPITULO 2

DETECCIÓN DE *Phakopsora arthuriana* EN *Jatropha curcas* L. EN MÉXICO

DETECTION OF *Phakopsora arthuriana* ON *Jatropha curcas* L. IN MEXICO

RESUMEN

Durante 2011 y 2012, se observaron síntomas severos de roya de la hoja en plantas de *Jatropha curcas* L. en Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, México. En plantas con infecciones severas se observó la defoliación total de la parte media inferior. El objetivo de este estudio fue identificar al agente causal de dicha enfermedad. Para la caracterización morfológica del hongo, se realizaron preparaciones semi-permanentes en glicerina con cortes longitudinales de las estructuras (uredios y telios) presentes en la superficie abaxial de las hojas. Mediante un análisis en microscopía de luz a una magnificación de 400 aumentos, se determinaron las características morfológicas cualitativas y cuantitativas de uredios, uredinosporas, paráfisis uredinales, telios y teliosporas. Basados en características morfológicas, el agente causal se identificó como *Phakopsora arthuriana* Buriticá & J. F. Hennen (*sin. P. jatrophicola*). Adicionalmente a la detección de *P. arthuriana*, se observó un 30 % de uredinosoros de la roya parasitados por picnidios de *Sphaerellopsis filum* (Biv.) B. Sutton (*sin. Darluca filum*).

Palabras clave: *Phakopsora jatrophicola*, *Sphaerellopsis filum*, roya, biocombustible.

ABSTRACT

During 2011 and 2012, rust symptoms were observed on *Jatropha curcas* L. leaves in Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, Mexico. Plants with severe infection showed total defoliation of inferior part. The objective of this study was to identify the causal agent of rust symptoms. The morphological characterization of fungus was performed by the examination of semi-permanent preparations of longitudinal sections of structures (uredinia and telia) located on the abaxial surface of leaves. By a light microscopy analysis using a 400 magnification were determined the qualitative and quantitative morphological characteristics of uredinia, urediniospores, uredinial paraphyses, telia and teliospores. Based on morphological characteristics, the causal agent was identified as *Phakopsora arthuriana* Buriticá & J. F. Hennen (*sin. P. jatrophicola*). Additionally, *Sphaerellopsis filum* (Biv.) B. Sutton (*sin. Darluca filum*) was found naturally parasiting 30% of *P. arthuriana* uredosorus.

Key words: *Phakopsora jatrophicola*, *Sphaerellopsis filum*, rust, biofuel.

INTRODUCCIÓN

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres muestreos dirigidos a plantas de *J. curcas* con síntomas típicos de roya en hojas durante el 2011 y 2012. Las hojas colectadas en campo se prensaron para facilitar su manipulación en estudios posteriores.

Los síntomas en la superficie abaxial de las hojas fueron pústulas errumpentes de color café-rojizo (uredios) a café oscuro (telios) (Figura 8A-B), mientras que, en la superficie adaxial se observaron inicialmente manchas café-amarillentas de forma irregular, las cuales se tornaron necróticas. En plantas con infecciones severas se observó la defoliación total de la parte media inferior. Para la caracterización morfológica del hongo, se realizaron preparaciones semi-permanentes en glicerina con cortes longitudinales de las estructuras (uredios y telios) presentes en la superficie abaxial de las hojas. Mediante análisis en microscopía de luz a 40X, se determinaron las características morfológicas cualitativas y cuantitativas de 20 uredios, 25 urediniosporas, 10 paráfisis uredinales, 20 telios y 25 teliosporas. La identificación del hongo a nivel de género se realizó con las claves especializadas de Cummins e Hiratsuka (2003), mientras que para la determinación de la especie se utilizaron las claves de Buriticá (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la caracterización morfológica mostraron uredios subepidermales, errumpentes, elipsoidales, de 137-212 x 125-160 μm (Figura 7C-D); urediniosporas elipsoidales-obovoides, unicelulares, con color amarillo-anaranjado, sésiles, equinuladas, de 24-33 x 18-24 μm (Figura 7C-D). Paráfisis uredinales claviformes, aseptados, color amarillo claro, rectos o curvados, de 25-

47 μm en longitud y de 7-10 μm de grosor en el ápice (Figura 8E). Telios subepidermales, no errumpentes, elipsoidales–ampuliformes, de 150-265 x 117-220 μm , y conteniendo de 8-12 capas de teliosporas (Figura 7F). Teliosporas cuboides-oblongas, unicelulares, subhialinas, sésiles, de 10.8-13.7 x 9.2-11.3 μm , y dispuestas irregularmente dentro del telio (Figura 7F). Los resultados anteriores coinciden con las características morfológicas de *Phakopsora arthuriana* Buriticá & J.F. Hennen (sin. *P. jatrophiicola*) reportadas por Buriticá (1999), Gomes-Carneiro *et al.* (2009) y Kobayashi *et al.* (2011).

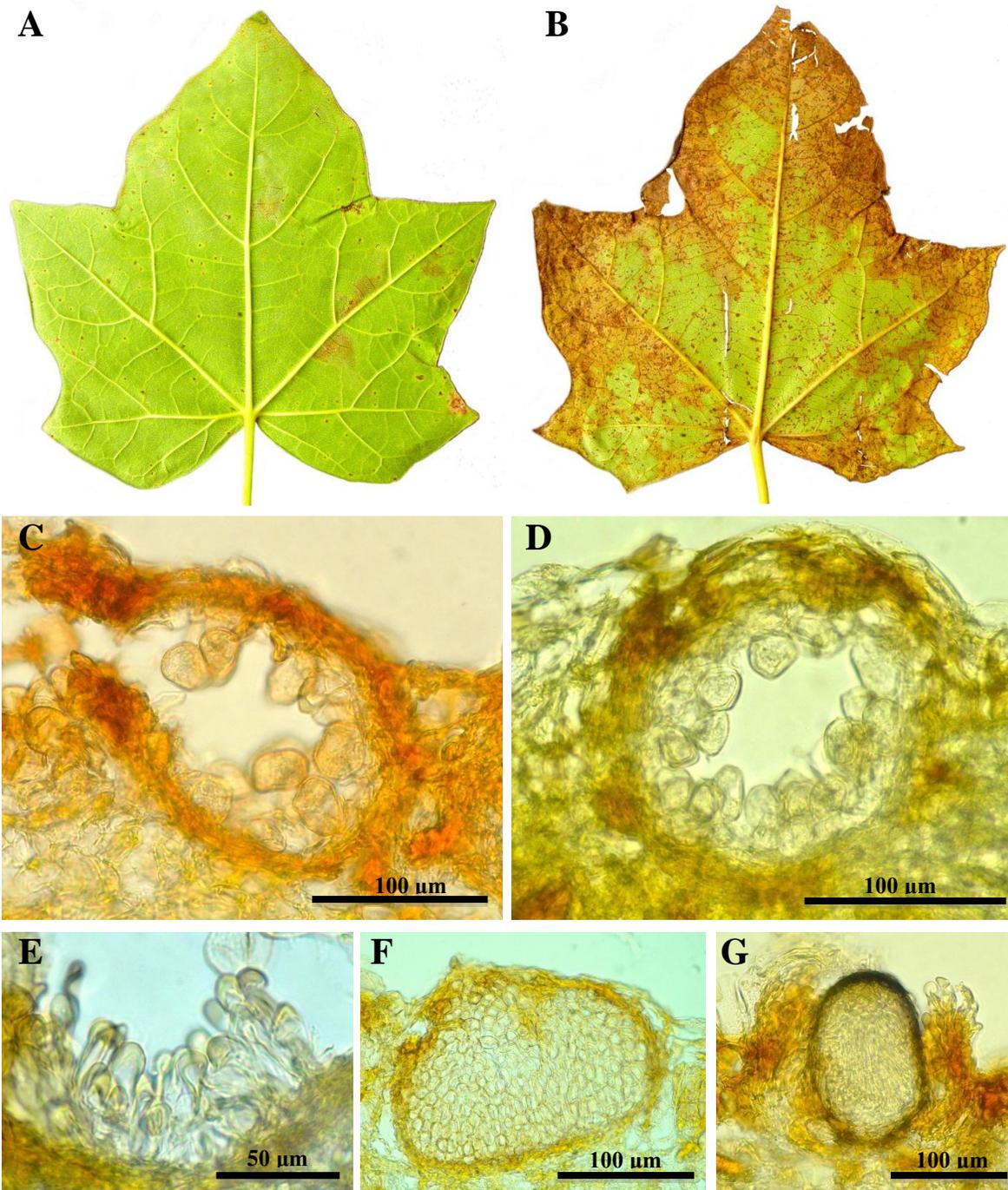


Figura 7. Síntomas y signos de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas*. (A) Síntomas iniciales en superficie abaxial de una hoja. (B) Síntomas severos en superficie abaxial de una hoja, mostrando necrosis y abundantes uredios. (C-D) Uredios con urediniosporas. (E) Paráfisis uredinales. (F) Telio con teliosporas. (G) Picnidio de *Sphaerellopsis filum* en cavidad uredinial.

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

La importancia fitosanitaria y económica de la roya en *J. curcas* en México, radica en los altos niveles de incidencia y severidad en los que puede presentarse cuando las condiciones ambientales son favorables tal y como se observó en Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, ya que este municipio presenta un clima templado húmedo con lluvias todo el año, el cual favoreció el progreso de la enfermedad. No obstante, es importante señalar que las huertas comerciales de *J. curcas* establecidas en México, se encuentran en lugares donde predominan diferentes condiciones (clima cálido subhúmedo con lluvias en verano), por lo cual posiblemente el patógeno no se ha establecido y reportado en estos sitios de producción.

Poco se conoce sobre el manejo de *P. arthuriana* en huertos comerciales de *J. curcas*. En Brasil, se recomienda evitar que los restos de hojas infectadas queden acumulados en el huerto, con la finalidad de disminuir la fuente de inóculo

primario (Vieira-Junior *et al.*, 2009), además se sugiere la aplicación de fungicidas sistémicos a base de tiofanato-metil + fuatrifol, pyraclostrobin + epixiconazol, los cuales se han reportado como efectivos para el control de este patógeno (Roese *et al.*, 2008).

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

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

LITERATURA CITADA

- Buriticá, C.P.** (1999). La familia Phakopsoraceae en el Neotrópico III, géneros: *Batistopsora* y *Phakopsora*. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 23(87):271-305.
- Cummins, G.B.** and Hiratsuka, Y. (2003). Illustrated Genera of Rust Fungi. 3rd Edition. APS Press. St. Paul Minnesota, USA. 240p.
- Fairless, D.** (2007). Biofuel: The little shrub that could – maybe. Nature 449:652–655.
- Gomes-Carneiro, S.M.T.P.; Medeiros-Ramos, A.L.; Romano, E.; Marianowski, T. e Oliveira, J.P.** (2009). Ocorrência de *Phakopsora jatrophiicola* em pinhão manso no estado do Paraná. Summa Phytopathologica 35(1):73.
- Kobayashi, L.; Da Silva, R.A. e Santaella, A.G.** (2011). Ocorrência de ferrugem (*Phakopsora arthuriana*) do pinhão manso em Mato Grosso. Revista de Ciências Agro-Ambientais 9(2):307-312.
- Liesebach, M.** and Zaspel, I. (2005). Biology and genetic diversity of the rust hyperparasite *Sphaerellopsis filum* in Central Europe. pp. 231-241. In: Pei MH and McCracken AR (eds.). Rust Diseases of Willow and Polar. CABI Publishing, Wallingford, UK. 264 p.
- Roese, A.D.; Silva, C.J.; Goulart, A.C.P. e Abrão, J.S.** (2008). Ocorrência da ferrugem no Pinhão-Manso, em Mato Grosso do Sul, e efeito de alguns

fungicidas no controle da doença. Comunicado Técnico, 145. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, Brasil. 3p.

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2011). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index (consulta, diciembre 2012).

Sutton, B.C. (1980). The Coleomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Vieira J., J.R.; Fernandes, C.F.; Rocha, R.B.; Ramalho, A.R.; Marcolan, A.L.; Guedes, M.L.O.; Reis, N.D. e Silva, D.S.G. (2009). Ocorrência da ferrugem (*Phakopsora jatrophiicola*) em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no Estado de Rondônia. Embrapa Rondônia 341:1-4.

CONCLUSIONES GENERALES

En la mayoría de las semillas se encuentran esporas de diferentes hongos potencialmente patogénicos para *J. curcas*, y que se desarrollan al momento de la germinación de las semillas, pudiendo así deteriorar la calidad de las semillas, así como la calidad fitosanitaria de las plántulas obtenidas. Además de que es una forma frecuente de transmisión de enfermedades.

También se identificaron hongos que deterioran la calidad de la semilla en almacén durante su almacenamiento, tales como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y otras de desarrollo saprofito como *Chaetomium* sp.

Los hongos como *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phacopsora arthuriana*, son especies que causa daños principales y demeritan el desarrollo de las plantas. Basado en las pruebas de patogenicidad realizadas para las especies mencionadas, desarrollándose los síntomas observadas en campo.