

INOCULACIÓN, SÍNTOMAS, Y COLONIZACIÓN EN ÁRBOLES DE MANZANO EN CONTENEDOR POR *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert

INOCULATION, SYMPTOMS, AND COLONIZATION IN CONTAINERIZED APPLE TREES BY *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert

Wesley Todd-Watson¹, David Nye-Appel², Michael Aloysius-Arnold³, Charles Miller-Kenerley², James Lester-Starr² y Tomás Martínez-Trinidad¹

¹Department of Forest Science, Texas A&M University, College Station, TX. 77843-2133. (t-watson@tamu.edu). ²Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2132. ³Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, College Station, TX 77843-2133.

RESUMEN

El conocimiento de las tasas de infección y colonización de patógenos de suelo en cultivos perennes es importante debido a que contribuye a determinar medidas de control de manera oportuna. Se llevaron a cabo estudios para evaluar los síntomas y colonización de raíces de manzano por *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert en contenedor durante 1997 y 1998 en College Station, Texas (EE.UU.). Árboles de tres años de edad en contenedores de 114 L fueron inoculados usando esclerocios. Los síntomas se detectaron después de nueve semanas y 100% de los árboles inoculados presentaron síntomas después de 15 semanas; en otros árboles inoculados al año siguiente sólo hubo 80% con síntomas de infección que se presentaron después de 12 semanas. En otro experimento se evaluó el movimiento del patógeno de raíces infectadas a raíces saludables de árboles adyacentes a través de raíces vivas, raíces muertas, y del suelo. A pesar de que se detectaron cordones miceliales 10 d después de la inoculación y que la viabilidad de esclerocios permaneció en 83% al final del experimento, no ocurrió una transmisión considerable ni la dispersión del hongo a través de las raíces de manzano o del suelo.

Palabras clave: *Phymatotrichum omnivorum*, enfermedades de raíz, patógenos del suelo, pudrición texana.

INTRODUCCIÓN

P*hymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert (= *Phymatotrichum omnivorum* Duggar) es un patógeno del suelo que causa serios problemas de pudrición de raíz en diferentes especies de árboles en el suroeste de EE.UU. y norte de México (Lyda, 1978; Percy, 1983; Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2003). Árboles de manzano, *Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf. (= *M. domestica* Borkh.), son altamente susceptibles a *P. omnivora*, agente causal de la pudrición texana (Taubenhaus *et al.*, 1929,

ABSTRACT

The understanding of infection and colonization rates of soil-borne pathogens on perennial crops is critical for determining proper timing of appropriate control measures. Studies were conducted to evaluate symptoms and colonization of roots of containerized apple trees by *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert during 1997 and 1998 at College Station, TX (USA). Three-year-old trees growing in 114 L containers were inoculated with sclerotia. Symptoms were detected after nine weeks, and 100% of the inoculated trees showed symptoms after 15 weeks. In another set of trees inoculated the second study year, there were only 80% showing symptoms of infection after 12 weeks. A separate experiment was developed to evaluate pathogen movement along live roots, dead roots, and through bare soil from an infected tree to adjacent healthy trees. Although fungal strands were visible within 10 days after inoculation and the viability of sclerotia was still around 83%, the experiment failed to produce extensive colonization and spread of the fungus on roots of apple trees or through the soil.

Key words: *Phymatotrichum omnivorum*, root diseases, soil pathogens, Texas root rot.

INTRODUCTION

P*hymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert (= *Phymatotrichum omnivorum* Duggar) is a soilborne pathogen that causes serious root rot problems on numerous plant species in the southwestern United States and northern México (Lyda, 1978; Percy, 1983; Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2003). Apple trees, *Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf. (= *M. domestica* Borkh.) are highly susceptible to *P. omnivora*, the causal agent of Texas root rot (Taubenhaus *et al.*, 1929, 1936). Apple orchards in central Texas have been affected by this pathogen causing substantial economic losses (Kenerley *et al.*, 1994). The fungus appears to spread within the orchards from discrete foci moving down and across tree rows

Recibido: Febrero, 2006. Aprobado: Marzo, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 459-468. 2007.

1936). Huertos en la parte central de Texas fueron afectados por este patógeno causando pérdidas económicas considerables (Kenerley *et al.*, 1994). La dispersión del hongo en los huertos aparentemente se realiza inicialmente en pequeños puntos y después se dispersa dentro y entre las hileras de árboles hasta causar el declinamiento o muerte de grupos de árboles. La mortandad anual en huertos con esta enfermedad es aproximadamente 15% (Kenerley *et al.*, 1994).

El árbol del manzano es infectado por los cordones miceliales que crecen a lo largo del sistema radical causando muerte de raíces, lo que puede causar la muerte del árbol. El hongo comúnmente sobrevive durante el invierno como esclerocios en el suelo y como cordones miceliales en las raíces de las plantas (Alderman y Hine, 1982; Lyda y Burnett, 1970; Watkins, 1938); sin embargo, en la parte central de Texas se han recolectado pocos esclerocios en huertos de manzano. El patógeno se puede aislar durante la fase de dormancia a través de micelio que coloniza raíces de árboles infectados (Kenerley *et al.*, 1994) y puede dispersarse de un árbol a otro dentro de un huerto mediante la interconexión del sistema radical de árboles adyacentes (Brinkerhoff y Streets, 1946; Kenerley *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 2000).

En huertos de manzano en la parte central de Texas, *P. omnivora* puede infectar árboles sin que éstos muestren síntomas iniciales en la parte aérea; sin embargo, los árboles infectados generalmente presentan un daño extenso de la raíz (Watson *et al.*, 2000). El desarrollo de los síntomas ha sido evaluado (Kenerley *et al.*, 1994), pero se ha estudiado poco el tiempo entre la primera infección y la expresión de síntomas. Aunque la interconexión entre las raíces de los árboles en un huerto puede ocurrir (Watson, 1999⁴), el efecto de dicha interconexión en la tasa de dispersión del hongo no se ha determinado. Si la interconexión sirve como la principal manera de dispersión del patógeno, entonces la remoción de árboles antes de ser infectados pudiera servir para controlar la dispersión de *P. omnivora*.

Los cordones miceliales pueden crecer en el suelo pequeñas distancias cuando el sistema radical no está presente (Lyda, 1978; Lyda y Kenerley, 1992). Es necesario determinar la capacidad del hongo para crecer a través del suelo y su crecimiento en raíces de árboles muertos. El retraso de la dispersión del hongo podría garantizar la remoción de árboles como un medio de control, y evaluar las zanjas entre árboles como medio alternativo de control. Los objetivos de este estudio fueron determinar el tiempo de aparición de síntomas de infección en árboles de manzano después de

until a patch of dead and dying trees is formed. Annual tree mortality in orchards due to *P. omnivora* is approximately 15% (Kenerley *et al.*, 1994).

Apple trees are infected by mycelial strands which grow along the root system killing the roots and eventually resulting in plant mortality. The fungus typically overwinters as sclerotia in soil and mycelial strands on the roots of plants (Alderman and Hine, 1982; Lyda and Burnett, 1970; Watkins, 1938); however, few sclerotia have been recovered from apple orchards in central Texas. The pathogen can be readily isolated throughout the dormant season from viable mycelium colonizing the roots of diseased trees (Kenerley *et al.*, 1994), and can be spread from tree to tree within an orchard by growing along the root system of adjacent trees (Brinkerhoff and Streets, 1946; Kenerley *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 2000).

In apple orchards within central Texas, *P. omnivora* can infect trees in advance of symptom expression in the canopy, but these infected trees usually exhibit extensive root damage (Watson *et al.*, 2000). Symptom development has been evaluated (Kenerley *et al.*, 1994), but little is known concerning the time between primary infection and symptom expression. Even though intermingling of roots among adjacent trees within an orchard can occur (Watson, 1999⁴), the effect of overlapping roots on the rate of pathogen spread has not been determined. If overlapping roots serve as a primary avenue for pathogen spread within an orchard, then removing trees in advance of the fungus infection may be an effective means of controlling the spread of *P. omnivora*.

Mycelial strands are also capable of growing through soil over short distances in the absence of roots (Lyda, 1978; Lyda y Kenerley, 1992). The ability of the pathogen to grow through soil and along dead roots of apple trees needs to be assessed. Tree removal or other techniques, such as trenching, may prove useful for retarding the spread of the pathogen between trees. The goal of this study was to determine the time required for apple trees to show symptoms following inoculation with *P. omnivora* as well as to determine the effect of roots and bare soil on the rate of fungal growth between adjacent trees.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1

Seventy five one-year-old apple trees (Gala on M26 rootstocks) susceptible to *P. omnivora* were planted in 114L plastic containers

⁴ Watson, W. T. 1999. Studies of the effect of apple root distribution on the spread of *Phymatotrichopsis omnivora* within apple orchards. Texas A&M University. Doctoral dissertation. 117 p.

la inoculación con *P. omnivora*, así como el efecto de la presencia de raíces y suelo en la tasa de crecimiento del hongo entre árboles adyacentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

Setenta y cinco árboles de manzano de un año de edad (Gala en el patrón M26) susceptibles a *P. omnivora* fueron plantados en contenedores de plástico (114 L) en el huerto de Texas Hill Country, en Kerrville, Texas (EE.UU.) en enero de 1995. Las plantas crecieron usando las prácticas de manejo común en la zona durante el experimento. El suelo usado en los contenedores fue un Typic Haplustoll de textura limo arcillosa recolectado en un área del huerto sin registro de *P. omnivora*. Durante este periodo los árboles fueron inspeccionados para asegurar que no tuvieran síntomas causado por el patógeno. Las plantas fueron transportadas a College Station, Texas, en julio de 1997.

Siete aislamientos de *P. omnivora* tomados de raíces de manzano extraídas en huertos de Texas Hill Country se usaron para inocular los árboles. Esclerocios de cada aislamiento fueron reproducidos como lo describen Lyda y Kenerley (1992). Después de 60 d, los esclerocios fueron tamizados en húmedo y se mezclaron para formar un compuesto. El 23 de agosto de 1997, 1 de noviembre de 1997 y 30 de enero de 1998 se inocularon 25 árboles usando 15 g del inóculo compuesto. Un orificio en el suelo de cada contenedor se hizo con un tubo de 2 cm de diámetro a una profundidad de 25 cm y a 3-5 cm del tronco de los árboles. El inóculo fue colocado en cada orificio, se rellenó con suelo y se regó cada contenedor a capacidad de campo. En cada fecha se preparó un nuevo inóculo de esclerocios. La viabilidad se evaluó colocando 100 esclerocios del inóculo compuesto en papel filtro humedecido a 27 °C por 5 d. (Kenerley y Jeger, 1990). Además, 20 semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L. cv. Paymaster HS-26) susceptible al hongo se sembraron en suelo inoculado con el mismo compuesto, como referencia sobre la patogenicidad del inóculo.

La colonización de las raíces y el porcentaje de árboles con síntomas de infección en raíz se evaluaron en intervalos de tres semanas (cinco árboles/evaluación) durante 15 semanas. Se consideró a un árbol colonizado cuando se observaron cordones miceliales característicos del patógeno en la raíz. Los árboles fueron removidos del contenedor y el sistema radical completo se lavó usando agua a presión para determinar la presencia de cordones miceliales. Las raíces laterales se separaron de acuerdo con su diámetro (finas < 1 mm; pequeñas 1-5 mm; grandes > 5 mm) y se examinaron para identificar lesiones causadas por la penetración e infección del hongo. Temperaturas máxima y mínima del aire y suelo se registraron usando una estación climatológica automatizada (Campbell Scientific, Logan, UT). La temperatura del suelo de los contenedores se midió con un termógrafo (Modelo 4030, Wathertronic, Inc. CA). Los esclerocios remanentes en cada evaluación se usaron para determinar su viabilidad, para lo cual las muestras de esclerocios de cada contenedor se incubaron en papel filtro humedecido como se

in Texas Hill Country Orchards in Kerrville, Texas (USA) in January 1995. Trees were grown using standard orchard management practices during the experiment. A silty-clay Typic Haplustoll soil from areas within the orchard with no history of *P. omnivora* was used in the containers. The trees were monitored during this time to ensure that none exhibited disease symptoms associated with *P. omnivora*. The containers were transported to College Station, TX in July, 1997.

Seven isolates of *P. omnivora* collected from apple roots excavated in Texas Hill Country Orchards were used to inoculate trees. Sclerotia of each isolate were produced as described by Lyda and Kenerley (1992). After 60 d, sclerotia from the seven isolates were wet sieved from the soil cultures and mixed to form a composite inoculum. Twenty-five trees were inoculated with 15 g of the composite inoculum on August 23, 1997, November 1, 1997, and January 30, 1998. A two-centimeter diameter coring tube was inserted 25 centimeters into the soil of each tree container within 3-5 centimeters from the trunk. The inoculum was placed into each hole, the soil replaced, and the container watered to field capacity. New sets of inocula were produced for each inoculation date. Viability of sclerotia was evaluated by placing 100 sclerotia from the inoculum mixture on moist filter paper at 27 °C for 5 d (Kenerley and Jeger, 1990). In addition, 20 cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L. cv. Paymaster HS-26) susceptible to the fungi were sown in soil to check the pathogenicity of the inoculum.

Root colonization and percentage of trees with symptoms were evaluated at three-week intervals (five trees/ assessment) over a 15-week period. Trees were considered colonized when fungal strands characteristic of the root pathogen were observed. The trees were removed from the container and soil was washed from the roots by using a stream of high-pressure water. Lateral roots were sorted by diameter (fine < 1 mm; small 1-5 mm; large > 5 mm) and examined for lesions caused by penetration and infection of the fungus. Maximum and minimum air and soil temperatures were recorded throughout the experiment using an automated weather station (Campbell Scientific, Logan, UT), and the soil temperature within the container was measured using a thermograph (Model 4030, Weathertronic, Inc., CA). Viability of sclerotia in containers was determined by retrieving the remaining sclerotia from each container at each assessment and incubating them on moist filter paper as described earlier. The results in each assessment were descriptively analyzed or using the Chi-square with the SAS software (SAS Institute, Cary, NC).

Experiment 2

This experiment was designed to study the colonization and spread of fungi between tree roots or through soil among adjacent trees. Three-year-old apple trees in plastic container (114 L) with silty-clay Typic Haplustoll soil were used. Four plastic containers were joined in a straight line with observation windows made from Lexan XL plastic (Worldwide Manufacturing, Mt. Vernon, IN). Opposing windows were spaced 5 cm apart and were firmly attached to the containers (Figure 1a). A hole, 5 cm wide and 30 cm long, was cut in the plastic container where the windows were connected

mencionó. Los resultados de cada evaluación se analizaron descriptivamente o con la prueba *ji* cuadrada (SAS Institute, Cary, NC).

Experimento 2

Este experimento se diseñó para estudiar la colonización y movimiento del hongo a través de raíces o suelo de árboles adyacentes. Se usaron árboles de tres años de edad en contenedores de plástico de 114 L rellenos con suelo Typic Haplustoll de textura limo arcillosa. Cuatro contenedores alineados fueron interconectados usando ventanas de observación hechas con plástico transparente Lexan XL (Worldwide Manufacturing, Mt. Vernon, IN). Dos ventanas de observación se colocaron opuestas a una distancia de 5 cm y se adhirieron fuertemente a los contenedores (Figura 1a). Se hizo un orificio (5 cm ancho; 30 cm alto) en los contenedores de plástico, donde se conectaron las ventanas de observación y se relleno el espacio con el mismo tipo de suelo usado en los contenedores. Ésto permitiría el crecimiento de las raíces por el espacio y el entrelazamiento de raíces de árboles adyacentes. Se instaló una ventana de observación adicional (15 cm ancho; 30 cm largo) en un extremo donde se colocó el inóculo. Hojas de unicel térmico (Rmax, Inc., Dallas, TX; valor-R 4.5) se colocaron sobre las ventanas de observación para evitar la luz y reducir sobrecalentamiento del suelo (Figura 1b).

Los árboles provinieron de un grupo del huerto donde algunos manzanos murieron seis meses después de que las raíces crecieron fuera del fondo de los contenedores, lo que mostró la susceptibilidad del hospedero. Los cuatro tratamientos (cinco repeticiones por tratamiento) fueron: cuatro árboles vivos; dos vivos en los extremos y dos muertos en el centro; dos árboles vivos en los extremos y dos contenedores sólo con suelo en el interior (este tratamiento permitiría evaluar el movimiento del hongo a través del suelo sin raíces); y cuatro árboles vivos sin inocular. La muerte de los árboles se indujo aplicando una solución de 2% (v/v) de glifosfato (Monsanto Co., St. Louis, MO) en el follaje un mes antes de que se conectaran a los otros contenedores.

Un árbol al extremo de cada unidad experimental se inoculó el 23 de agosto de 1997, aproximadamente un mes después de construir las ventanas de observación, usando 15 g de esclerocios de un compuesto de siete aislamientos similar al usado en el experimento 1. La viabilidad de los esclerocios se determinó de la misma manera que en el experimento 1. El mismo árbol fue reinoculado con 15 g de esclerocios el 1 de noviembre de 1997 en diferente lugar al de la inoculación inicial. El 13 de junio de 1998 los mismos árboles se inocularon usando 80 g de esclerocios distribuidos de manera homogénea en ocho lugares diferentes a 15 cm del tronco del árbol. Al igual que en el experimento 1, se inocularon semillas de algodón con el mismo compuesto de esclerocios para corroborar su patogenicidad.

Los árboles se mantuvieron en un vivero en College Station, TX, para simular el ambiente natural del patógeno y se inspeccionaron cada semana para registrar la presencia de cordones miceliales en las ventanas de observación considerando que a diferencia de otros patógenos, *P. omnivora* puede observarse a simple vista (Rush

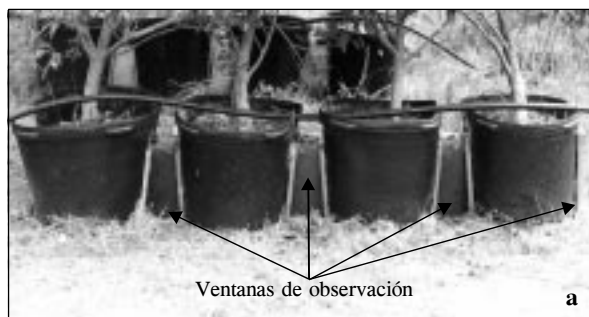
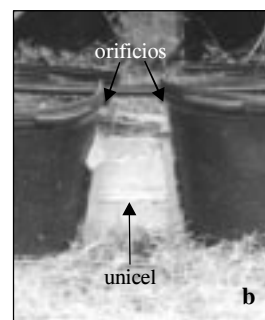


Figura 1. Distribución de las ventanas de observación utilizadas para monitorear el desarrollo del hongo entre las raíces de árboles adyacentes.

Figure 1. Distribution of the observation windows used for monitoring fungal development along roots of adjacent trees.



and filled with the same type of soil used in the containers, which allowed the roots to grow between the windows and overlap with roots of adjacent trees. An additional observation window (15 cm wide×30 cm long) was placed at the end of the container where inoculum was placed. Foil-backed foam insulation (Rmax, Inc., Dallas, TX; R-value=4.5) was placed over the observation windows to exclude light and to reduce solar heating of the soil (Figure 1b).

Trees were taken from an orchard area where trees died within six months after roots grew out of the bottom of containers, demonstrating host susceptibility. The four treatments (five replicates per treatment) consisted of four live trees; two live trees at the ends and two dead in the center; two live trees and two containers with soil only in the center (this treatment allows determining the rate of fungal movement through soil without roots); and four live trees without inoculation. The trees were killed by spraying a 2% (v/v) solution of glyphosate (Monsanto Co., St. Louis, MO) on the leaves one month before being joined to the other containers.

One tree at the end of each experimental unit was inoculated on August 23, 1997, about one month after construction of the observation windows, with 15 g of sclerotia using a mixture of seven fungal isolates in a similar as described in Experiment 1. Sclerotia viability was determined as described in Experiment 1. The same tree was re-inoculated with 15 g of sclerotia on November 1, 1997, in a separate location from the initial inoculation area. On June 13, 1998, the same trees were again inoculated with an additional 80 g of sclerotia distributed evenly in eight separate locations spaced 15 cm from the trunk. As in the first experiment, cotton seeds were inoculated using the same sclerotia composite to determine pathogenecity.

Trees were maintained in a nursery in College Station, TX, to simulate the natural environment of the pathogen and were monitored weekly for the presence of visible strands in the observation windows.

et al., 1984). El riego se hizo con agua a un pH 7.2 y se fertilizó cada dos semanas durante la etapa de crecimiento (20-20-20; The Scotts, Marysville, OH). La maleza en los contenedores se controló usando glifosato a 1% (v/v). La temperatura máxima y mínima diaria se registraron de manera similar al experimento 1. En julio de 1998 se recuperaron 300 esclerocios de la inoculación hecha en agosto de 1997 en cada contenedor, para determinar la supervivencia de los esclerocios. Las raíces de los árboles inoculados fueron cortadas en las ventanas de observación del segundo contenedor para evitar que crecieran hacia los otros contenedores. Los tratamientos se distribuyeron con base en un diseño experimental completamente al azar; se hizo un análisis de varianza y la prueba Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando SAS.

RESULTADOS

Experimento 1

Los síntomas de infección en la raíz de los árboles inoculados en agosto se observaron nueve semanas después de la inoculación (Figura 2a). En la tercera fecha de inoculación, los árboles empezaron a mostrar síntomas en la raíz a las 12 semanas (Figura 2c). Después de 15 semanas de incubación, 100% de los manzanos inoculados en agosto y 80% de los inoculados en enero presentaron síntomas en la raíz al momento de la evaluación final, pero ningún árbol inoculado en noviembre manifestó síntomas de la infección (Figura 2b). No hubo síntomas de la enfermedad en la parte aérea de los árboles con síntomas de infección en la raíz.

Algunas de las plantas inoculadas presentaron raíces con lesiones de color café, cordones miceliales y señales de deterioro. El micelio y la necrosis se expandieron longitudinalmente a lo largo de las raíces, y la mayoría de los árboles con cordones miceliales presentaron pocas raíces con síntomas cerca del sitio de inoculación (Cuadro 1). En el árbol cuatro, evaluado el 6 de diciembre de 1997, el 50% de la raíz principal fue dañada y deteriorada. Las hifas a lo largo de las raíces examinadas crecieron de manera previa a la necrosis. Se encontraron varias raíces finas (< 1 mm diámetro) cerca del sitio de inoculación; la infección de raíces pequeñas (< 5 mm diámetro) al parecer precedió la infección de raíces grandes (> 5 mm diámetro) en los contenedores. No se detectaron síntomas de infección en los árboles testigo. De las plantas de algodón sembradas en suelo inoculado en un ensayo alternativo, 100% mostró síntomas y murieron dos meses después de la inoculación.

Para determinar la viabilidad del inóculo se recolectaron esclerocios del sitio donde fueron colocados en cada evaluación (Figura 3). De cada árbol se colocaron 20 esclerocios en papel filtro humedecido del

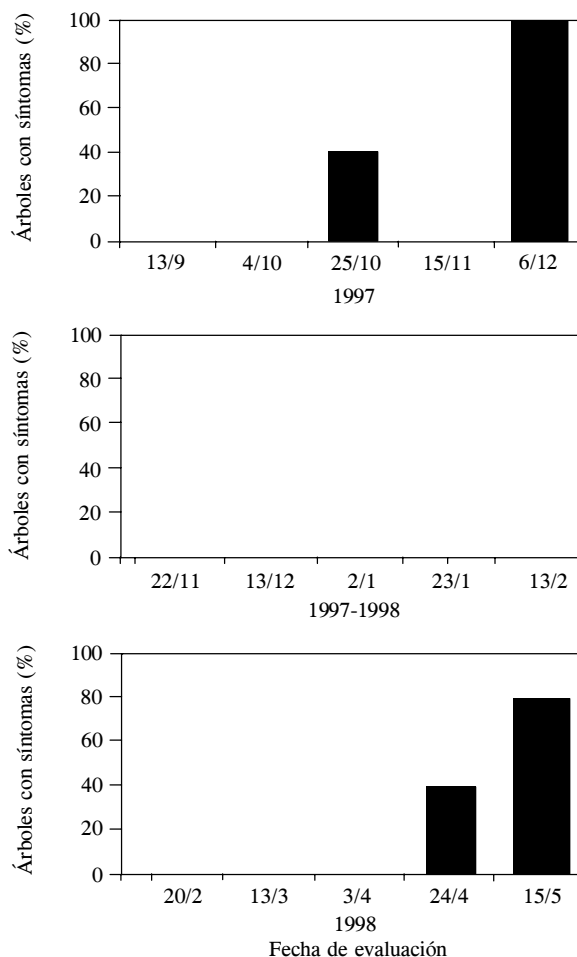


Figura 2. Porcentaje de árboles con síntomas de infección después de ser inoculados con esclerocios de *P. omnivora* en tres fechas: a) 23 de agosto de 1997; b) 1 de noviembre de 1997; c) 30 de enero de 1998.

Figure 2. Percentages of trees with root infection symptoms after being inoculated with sclerotia of *P. omnivora* on three assessment dates: a) August 23, 1997; b) November 1, 1997; c) January 30, 1998.

As opposed to other soil-borne pathogens, *P. omnivora* mycelia can be seen with the naked eye (Rush *et al.*, 1984). Trees were irrigated with water with a pH of 7.2 and were fertilized biweekly during the growing season (20-20-20; The Scotts Co., Marysville, OH). Weeds in containers were controlled using a 1% (v/v) solution of glyphosate. Maximum and minimum daily air and soil temperatures were measured throughout the experiment using the same procedure as Experiment 1. In July 1998, 300 sclerotia were retrieved from the initial inoculation made in August 1997 in each of the containers to determine long-term sclerotial survivability. To prevent roots from growing across the containers, roots from the inoculated tree were cut at the observation window. Treatments were distributed under a complete randomized experimental design, and the results were subjected to an analysis of variance and to the Tukey test ($p \leq 0.05$) using SAS.

Cuadro 1. Número y diámetro de las raíces de manzano que mostraron síntomas por *P. omnivora* en diferentes fechas de otoño 1997 y primavera 1998.

Table 1. Numbers and diameters of apple roots exhibiting infection symptoms from *P. omnivora* on different dates in Fall 1997 and Spring 1998.

Árbol	Diámetro de raíz (mm)	Número de raíces con síntomas [†] de la inoculación			
		Agosto de 1997		Enero de 1998	
		25/10/97	6/12/97	24/4/98	15/5/98
1	1-5	0	2	0	6
	>5	0	0	0	2
2	1-5	0	1	2	2
	>5	0	0	0	0
3	1-5	2	2	0	10
	>5	0	0	0	0
4	1-5	0	4	3	0
	>5	0	2	0	0
5	1-5	1	2	0	2
	>5	0	0	0	0

[†] Número total de raíces con síntomas y cordones miceliales en cada fecha de evaluación ♦ Total numbers of roots with symptoms and fungal strands at each assessment date.

total de esclerocios recolectados del suelo. No hubo diferencias ($p > 0.05$) en el número de esclerocios recuperados, excepto en las últimas fechas después de la inoculación de enero, pero se recuperaron menos de 20 esclerocios de la mayoría de las repeticiones en las últimas tres evaluaciones. No hubo diferencias ($p > 0.05$) en la viabilidad de esclerocios utilizados en las tres fechas de inoculación. La germinación fue 100% al momento de la inoculación y mayor a 90% en cada muestreo subsecuente.

Experimento 2

Se encontraron cordones miceliales en el extremo de las cajas desde marzo 1998 a junio 1999; en julio de 1998 se recolectaron 20 esclerocios por contenedor del sitio donde se depositaron en agosto de 1997, y de los 300 esclerocios recuperados 87% fueron viables después de un año. Adiciones subsecuentes de esclerocios en noviembre de 1997 y junio de 1998 parecieron no afectar la formación de cordones miceliales o síntomas, y ningún cordón micelial se detectó en el primer grupo de ventanas de observación desde agosto de 1997 a agosto de 1999. Todas las plantas de algodón inoculadas con la misma mezcla de esclerocios usado para los manzanos, murieron después de siete semanas.

El 30 de agosto de 1999 las cajas fueron desensambladas y las raíces de los árboles inoculados examinadas para detectar la presencia de micelio, debido a que no se detectaron cordones miceliales en las ventanas

RESULTS

Experiment 1

Infection symptoms in roots of trees inoculated in August were first observed nine weeks after inoculation (Figure 2a). On the third inoculation date, trees began showing symptoms of infection within 12 weeks of inoculation (Figure 2c). After a 15-week incubation period, 100% of the trees inoculated in August and 80% of the trees inoculated in January exhibited symptoms of infection on the roots during the final assessment. However, no trees that were inoculated in November exhibited infection symptoms (Figure 2b). None of the trees showing root infection symptoms exhibited aboveground symptoms.

Some inoculated trees exhibited roots with brown lesions, fungal strands, and signs of deterioration. Strands and root necrosis expanded longitudinally along the root, and most of the trees with fungal strands had a few roots with symptoms near the site of inoculation (Table 1). In tree four, assessed on December 6, 1997, 50% of the taproot was infected and deteriorating. On all roots examined, strands along the roots grew in advance of root necrosis. Numerous fine roots (<1 mm diameter) were found around the site of inoculation. Infection of smaller roots (<5 mm diameter) appeared to precede infection of larger roots (>5 mm diameter) within the containers. No infection symptoms were detected in the control trees. For cotton plants that were sown in an inoculated soil in a separate trial, 100% showed symptoms and died two months after the inoculation.

To determine inoculum viability, sclerotia were retrieved at each assessment from the site of sclerotia placement (Figure 3). For each tree, 20 sclerotia from the total number of sclerotia recovered from the soil were placed on moist filter paper. There were no differences ($p > 0.05$) in the number of sclerotia retrieved except on the last assessment dates in the January, but fewer than 20 sclerotia were retrieved from most of the replicates within the last three assessments. There were no differences ($p > 0.05$) in viability of sclerotia used on the last three assessment dates. Sclerotia germination was 100% at the time of inoculation and greater than 90% at each subsequent sample date.

Experiment 2

Strands were seen in the ends of the boxes from March 1998 to June 1999. In July 1998, 20 sclerotia per pot were retrieved from the site of initial sclerotia placement in August 1997. Of the 300 sclerotia

de observación en las inspecciones semanales. Después de lavar las raíces con agua a presión no se detectaron cordones miceliales en los árboles adyacentes al inóculado; sin embargo, la tercera parte de la raíz principal estaba deteriorada en siete de 15 árboles inoculados. No se detectó evidencia de necrosis o deterioro en el resto del sistema radical, ni presencia de necrosis en los árboles testigo.

La copa de 11 de 15 árboles inoculados fue notablemente más pequeña y presentó un número menor de hojas y más pequeñas que los árboles testigo; cuatro de estos árboles presentaron muerte ascendente de la copa. Hubo pequeñas diferencias entre la temperatura mínima y máxima del suelo en los contenedores durante el experimento. Debido a una alta correlación entre la temperatura del suelo del campo y del contenedor, sólo se registraron las temperaturas del suelo del campo (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Los resultados de experimentos con *P. omnivora* usando árboles frutales pueden ser confusos cuando se comparan con resultados de cultivos anuales como algodón. Hay problemas para inocular con éxito plantas perennes (Lyda y Kenerley, 1992; Streets y Bloss, 1973; Taubenhau *et al.*, 1936) y la razón de las fallas no se comprende completamente. A pesar de las altas tasas de mortandad en huertos, frecuentemente los resultados son variables con bajas tasas de mortandad (Brinkerhoff y Streets, 1946).

En el presente estudio los árboles de manzano mostraron los síntomas de manera lenta, en comparación con los resultados en plantas de algodón (Kenerley y Jeger, 1990; Rush *et al.*, 1984); además, la colonización fue baja y el movimiento del hongo no se detectó. Según Taubenhau *et al.* (1936), puede tomar dos a siete años para que los árboles de manzano puedan ser seriamente afectados y morir por *P. omnivora*. Sin embargo, en huertos de manzano de la parte central de Texas el patógeno puede infectar y matar árboles en pocos meses (Kenerley *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 2000). A pesar de usar al mismo hospedante, patógeno, y suelo expuesto a un ambiente similar de los huertos, no se observó mortandad de árboles después de 22 meses en contenedores en ambos experimentos.

Una posible causa en la diferencia de colonización por parte del hongo entre condiciones de campo y experimentos controlados, pudo ser una pérdida en la patogenicidad y agresividad de los aislamientos del hongo en cultivo. Sin embargo, en el estudio se usaron diferentes aislamientos recolectados de árboles de manzano que presentaron sintomatología en diferentes tiempos y lugares del huerto. Aunque se mostró que los

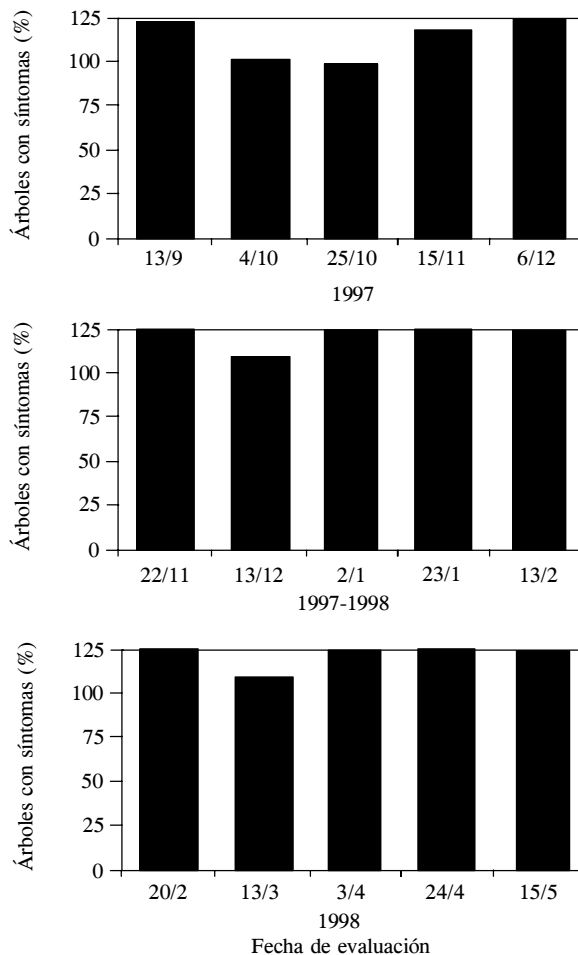


Figura 3. Número de esclerocios de *P. omnivora* recuperados de inoculaciones realizadas en tres fechas: a) 23 de agosto de 1997; b) 1 de noviembre de 1997; c) 30 de enero de 1998.

Figure 3. Number of sclerotia of *P. omnivora* retrieved from initial inoculations on three dates: a) August 23, 1997; b) November 1, 1997; c) January 30, 1998.

retrieved, 87% were still viable after one year. Subsequent additions of sclerotia in November 1997 and June 1998 appeared to have no effect on strand formation or symptom development. No strands were seen in the first set of opposing observation windows from August 1997 to August 1999. All the cotton plants inoculated with sclerotia from identical isolates died after seven weeks.

On August 30, 1999, the boxes were disassembled and the roots of the inoculated trees were examined for the presence of strands because no strands were visible in the observation window during the weekly inspections. After washing roots using high-pressure water, no strands were detected in the trees adjacent to the inoculated tree; however, the lower third of the taproot on seven of the 15 inoculated trees was deteriorated. There was no

aislamientos fueron patogénicos en los árboles de manzano (experimento 1), el hongo no produjo colonización del sistema radical de manzano de una manera extensiva (experimento 2). Inicialmente se especuló que la densidad del inóculo podría tener una función en el desarrollo de síntomas; pero la adición de 80 g de esclerocios sobre la cantidad de inóculo aplicada inicialmente y en función de que los esclerocios estaban viables después de un año, el bajo número de raíces de manzano con síntomas no podría atribuirse a una elevada mortandad de los esclerocios.

Otra probable razón por la cual no se logró la colonización de raíces de manzano por *P. omnivora* pudo ser que el hospedante se encontraba en un estado de baja susceptibilidad al hongo y en el experimento 2 se trató de analizar dicha situación. En el huerto de Texas Hill Country se produjeron varios árboles en contenedores para mantener árboles en áreas del huerto donde se habían presentado infestaciones previas de *P. omnivora*. Las raíces de varios árboles crecieron en los orificios de la base de los contenedores y en el suelo naturalmente infestado, por lo que estos árboles fueron susceptibles y murieron pocos meses después de haber estado en contacto con el suelo. Pero a pesar de que se usaron del mismo grupo de árboles, éstos no fueron dañados al inocularlos con el patógeno.

Los árboles se mantuvieron en el exterior con el propósito de simular las condiciones del huerto Texas Hill Country. Los resultados descritos también se pueden deber a la temperatura de los contenedores, ya que los aislamientos fueron patogénicos y el hospedero era susceptible al hongo. Sin embargo, después de comparar la temperatura del suelo entre los contenedores y el campo, se detectó poca diferencia entre ambas. A excepción de la aplicación de herbicida, los árboles en el vivero de College Station se mantuvieron en condiciones similares a los de Kerrville. Se usó suelo originario de los huertos sin esterilizar, además de mantener condiciones alcalinas del pH del suelo y agua durante los experimentos.

La principal diferencia en las prácticas culturales entre el huerto y los experimentos fue el control de malezas. Es probable que *P. omnivora* primeramente afecte plantas herbáceas, y una vez que se establece en suelo, entonces infecte exitosamente y colonice árboles perennes como el manzano. Las malezas afectan la tasa de movimiento del patógeno en huertos (Taubenhaus *et al.*, 1929; Wolff, 1936), lo cual puede aplicarse a huertos en la parte central de Texas debido a una gran presencia de malezas como diente de león (*Taraxacum* spp.), trébol (*Trifolium* spp.), cardo (*Salsola* spp.) y otras plantas de hoja ancha susceptibles a *P. omnivora* (Wolff, 1936). Los huertos infestados con *P. omnivora* generalmente se encuentran

evidence of necrosis or deterioration on the remainder of the inoculated root system, and no root necrosis was seen in the control trees.

The canopy of 11 of the 15 inoculated trees was noticeably stunted and had fewer and smaller leaves than the controls. Four of the stunted trees had dieback within the canopies. There were few differences between the minimum and maximum soil temperatures within the containers throughout the experiment. Due to the high correlation between field soil temperatures and container soil temperatures, only field soil temperature was recorded (data not shown).

DISCUSSION

Results from experiments with *P. omnivora* on fruit trees can be perplexing when compared to annual crops such as cotton. There have been problems inoculating perennial crops (Lyda y Kenerley 1992; Streets and Bloss, 1973; Taubenhaus *et al.*, 1936) and the reasons for failure are not fully understood. Despite the high rates of mortality seen in orchards, frequently there are variable results with low tree mortality (Brinkerhoff and Streets, 1946).

In our study, apple trees did not exhibit symptoms after inoculation as quickly as cotton plants (Kenerley and Jeger, 1990; Rush *et al.*, 1984). Colonization remained low and movement of the fungus was not detected. According to Taubenhaus *et al.* (1936) it may take two to seven years for apples to succumb and die from *P. omnivora*; however, in apple orchards in central Texas, the pathogen can infect and kill trees within a few months (Kenerley *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 2000). Even when the same host, pathogen, and soil exposed to a similar environment as the apple orchards were used, apple mortality was not observed after 22 months in a containerized system in both experiments.

One possible cause of the differences in fungal colonization between field conditions and controlled experiments may be due to a loss of pathogenicity or aggressiveness of some of the isolates of the fungus in culture. However, several isolates were used in the experiments that were recovered from apple roots of symptomatic trees at different times and locations within the orchard. Although we have shown that the isolates were pathogenic on apple (Experiment 1), the fungus was unable to colonize the root system of apples extensively (Experiment 2). We originally speculated that inoculum density might play a role in the development of symptoms, but an additional 80 g of sclerotia added to the initial inoculum failed to cause extensive infection. Since sclerotia were still viable after a year, the low number of infected apple roots was not due to high sclerotia mortality.

libres de ese tipo de malezas, a excepción de malezas de tipo monocotiledóneas.

Los resultados del presente estudio proveen evidencia sobre el tiempo requerido para la aparición de síntomas de infección en árboles de manzano, una vez que las raíces están en contacto con esclerocios. Además, los árboles pueden ser infectados durante el otoño y primavera. Un hecho probablemente más importante es que se proporciona información para estudios relacionados con el desarrollo de patrones resistentes o medidas de control de *P. omnivora* en árboles de manzano.

CONCLUSIONES

Los síntomas de infección del sistema radical de árboles de manzano por *P. omnivora* se presentaron en un período de 9 a 12 semanas después de estar expuestos a la presencia de esclerocios del hongo. Sin embargo, la infección puede depender de la época del año y, posiblemente, de la patogenicidad del hongo o la susceptibilidad de las plantas. A pesar de la detección de cordones miceliales en árboles inoculados con esclerocios de *P. omnivora*, en este experimento no se detectó el movimiento del hongo a través del sistema radical o del suelo a árboles adyacentes.

LITERATURA CITADA

- Alderman, S. C., and R. B. Hine. 1982. Vertical distribution in soil and induction of disease by strands of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathol.* 72: 409-412.
- Brinkerhoff, L. A., and R. B. Streets. 1946. Pathogenicity and pathological histology of *Phymatotrichum omnivorum* in a woody perennial—the pecan. *Arizona Agric. Exp. Station Bull.* 111 p.
- Kenerley, C. M., and M. J. Jeger. 1990. Root colonization by *Phymatotrichum omnivorum* and symptom expression of *Phymatotrichum* root rot in cotton in relation to planting date, soil temperature and soil water potential. *Plant Pathol.* 39:489-500.
- Kenerley, C. M., K. Ivors, D. N. Appel, and S. Nelson. 1994. Spatial and temporal dynamics of epidemics in apple orchards caused by *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology* 84: 1142.
- Lyda, S. D. 1978. Ecology of *Phymatotrichum omnivorum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 16:193-209.
- Lyda, S. D., and E. Burnett. 1970. Sclerotial inoculum density of *Phymatotrichum omnivorum* and development of *Phymatotrichum* root rot in cotton. *Phytopathol.* 60:729-731.
- Lyda, S. D., and C. M. Kenerley. 1992. *Phymatotrichum*. In: Singleton, L. L., J. D. Mihail, and C. M. Rush (eds). *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, St. Paul, MN, pp:145-148.
- Percy, R. G. 1983. Potential range of *Phymatotrichum omnivorum* as determined by edaphic factors. *Plant Dis.* 67: 981-983.
- Rush, C. M., P. R. Upchurch, and T. J. Gerik. 1984. *In situ* observations of *Phymatotrichum omnivorum* with a borescope mini-rhizotron system. *Phytopathol.* 74: 104-105.
- Samaniego-Gaxiola, J. A., T. Herrera-Pérez, A. Pedroza-Sandoval, F. Jiménez-Díaz, y Y. I. Chew-Madinaveitia. 2003. Fluctuación de la severidad de pudrición texana *Phymatotrichopsis*

Another possible reason for failure of *P. omnivora* to colonize apple roots could be that the host was not in a susceptible stage of development, and Experiment 2 was initiated to investigate this possibility. In Texas Hill Country Orchards, numerous trees were grown in containers in an attempt to produce apples in areas of the orchard where previous infections of *P. omnivora* were reported. The roots of several trees grew through the drain holes at the bottom of the containers and into the naturally infested soil. These trees died within a few months after infection, indicating the susceptibility of the host. Even though trees were selected from this susceptible group, they were not extensively colonized after being inoculated with the pathogen.

Trees were grown outdoors to simulate the natural environmental conditions present in Texas Hill Country Orchards. The described results could have been caused by adverse temperatures in the containers since the isolates were pathogenic and the host was susceptible. However, after comparing soil temperature within the containers to field soil temperature, little difference was observed between the two. Except for herbicide applications, the trees in the nursery in College Station were maintained in similar conditions to those in Kerrville. The soil used in the containers was native, unsterilized soil collected from the orchards; besides, pH of the soil and water remained slightly alkaline throughout the experiment.

One main difference in management practices between the orchard and the controlled experiments was weed control. It is plausible that *P. omnivora* first infects herbaceous dicots until it has established a sufficient soil population, and then infects and colonizes woody perennials such as apple trees. Weeds can affect the rate of pathogen movement within orchards (Taubenhaus *et al.*, 1929; Wolff, 1936), which may apply to orchards in central Texas heavily infested with dandelions (*Taraxacum* spp.), clover (*Trifolium* spp.), thistle (*Salsola* spp.) and other broadleaf plants susceptible to *P. omnivora* (Wolff, 1936). Orchards infested with *P. omnivora* usually become free of these types of weeds except for monocots.

This study provides evidence about the time required for apple trees to show infection symptoms once roots come in close proximity to sclerotia. In addition, trees can be infected in the Fall and Spring. Perhaps more important, information is provided for studies related to development of resistant rootstocks or control measures against *P. omnivora* for apple trees.

CONCLUSIONS

Apple tree roots inoculated with *P. omnivora* exhibited symptoms of infection within a period of 9 to

- omnivora* (Duggar) Hennebert en nogal pecanero (*Carya illinoensis* K.) bajo las condiciones de la Comarca Lagunera, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21(2): 143-151.
- Streets, R. B., and H. E. Bloss. 1973. Phymatotrichum root rot. Monographs of the American Phytopathological Society No. 8. Tucson, AZ. 38 p.
- Taubenhaus, J. J., B. F. Dana, and S. E. Wolff. 1929. Plants susceptible or resistant to cotton root rot and their relation to control. Texas Agric. Exp. Station Bull. 393. 30 p.
- Taubenhaus, J. J., C. H. McDowell, and L. E. Brooks. 1936. Susceptibility of apple varieties to Phymatotrichum root rot. Texas Agric. Exp. Station, 49th Ann. Report. pp: 85-95.
- Watkins, G. M. 1938. Histology of Phymatotrichum root rot of field grown cotton. Phytopathol. 28: 195-202.
- Watson, W. T., C. M. Kenerley, and D. N. Apple. 2000. Visual and infrared assessment of root colonization of apple trees by *Phymatotrichopsis omnivora*. Plant Dis. 84:539-543.
- Wolff, S. E. 1936. Test of weeds. Texas Agric. Exp. Station, 49th Ann. Report. pp: 321-327.

12 weeks after being exposed to sclerotia. However, infection might depend on the season within the year and, possibly, on pathogenecity of the fungus, or the susceptibility of the plants. Even when fungal strands were detected on the roots of inoculated trees using sclerotia of *P. omnivora*, the fungus movement to adjacent trees along roots or through the soil was not detected in this experiment.