

## Supervivencia de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* en función del pH *in vitro*\*

### Survival of the sclerotia of *Phymatotrichopsis omnivora* as a function of pH *in vitro*

José Alfredo Samaniego Gaxiola<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental La Laguna - INIFAP. Blvd. Prof. José Santos Valdez # 1200 Pte. Matamoros, Coahuila, México. C. P. 27440. Tel: (871)1 82 30 81. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

#### Resumen

*Phymatotrichopsis omnivora* es un hongo fitopatógeno que ataca a miles de especies de plantas, principalmente en suelos alcalinos. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de los esclerocios de *P. omnivora* para cambiar el pH y sobrevivir en soluciones ácidas y amortiguadoras. Los esclerocios fueron colocados dos semanas en soluciones de ácido acético (0.4, 0.8 y 1.7 mmol L<sup>-1</sup>) y sulfúrico (0.25, 0.5 y 1 mmol L<sup>-1</sup>), éstas soluciones no se recambiaron o se hicieron una, dos o tres veces. Los esclerocios también se pusieron siete días en soluciones amortiguadoras (pH 4, 5, 8 y 9) sin diluir o diluidas a razón de 1:2, 1:4 y 1:10 v/v. Otros esclerocios se colocaron en soluciones selectas de ácido sulfúrico 0.5 mmol L<sup>-1</sup> y amortiguadora a pH 5 diluida 1:10, luego se extrajeron y fueron sometidos a tratamientos de estrés. Estos tratamientos consistieron en colocar los esclerocios en: solución de NaOCl, arena inundada con glucosa, arena inundada, y arena a capacidad de campo. Los esclerocios cambiaron el pH de las soluciones de ácido acético sin recambio, y amortiguadoras de pH 8 y 9 diluidas 1:10. Pero, el cambio de pH de las soluciones fue marginal cuando los ácidos no se recambiaron y las soluciones amortiguadoras no se diluyeron. La supervivencia de los esclerocios fue nula con tres recambios de de ácido sulfúrico a 1 mmol L<sup>-1</sup> y en soluciones amortiguadora de pH 4, pH 5 diluida 1:4 o

#### Abstract

*Phymatotrichopsis omnivora* is a phytopathogenic fungus that attacks thousands of species of plants, mainly in alkaline soils. In this study, we assessed the capacity of sclerotia of *P. omnivora* to change the pH and survive in acidic and buffer solutions. The sclerotia were placed in acetic (0.4, 0.8 and 1.7 mmol L<sup>-1</sup>) and sulfuric acid solutions (0.25, 0.5 and 1 mmol L<sup>-1</sup>) for two weeks; these solutions were not replaced or were remade one, two or three times. The sclerotia were also put in buffer solutions for seven days (pH 4, 5, 8 and 9), undiluted or diluted at 1:2, 1:4 and 1:10 v/v. Other sclerotia were placed in selected solutions of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid and in buffer solutions with pH 5 diluted 1:10; they were then extracted and subjected to stress treatments. These treatments consisted in placing the sclerotia in: NaOCl solution, sand saturated with glucose, flooded sand, and sand at field capacity. The sclerotia changed the pH of the acetic acid solutions without replacement, and the Ph of buffer solutions with pH 8-9 diluted 1:10. However, the change of pH of the solutions was marginal when the acids were not replaced and when the buffer solutions were not diluted. The survival of the sclerotia was null with three replacements of sulfuric acid at 1 mmol L<sup>-1</sup> and in buffer solutions with pH 4 and 5 diluted 1:4 or less, and with pH 9 undiluted; some sclerotia survived in the rest of the solutions. Stress

\* Recibido: abril de 2012  
Aceptado: enero de 2013

menos, y pH 9 sin diluir; en el resto de las soluciones, algunos esclerocios lograron sobrevivir. Los tratamientos de estés tuvieron un efecto sinérgicos en disminuir la supervivencia de los esclerocios que previamente fueron colocados en las soluciones selectas (ácido sulfúrico 0.5 mmol L<sup>-1</sup> y amortiguadora a pH 5 diluida 1:10).

**Palabras clave:** ácidos grasos volátiles, hongos fitopatógenos en suelo, materia orgánica.

## Introducción

*Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, se distribuye principalmente en suelos alcalinos, ataca las raíces de más de 2 000 especies de plantas y se encuentra solo en México y Estados Unidos de América (Uppalapati *et al.*, 2010). Los rangos de pH en el suelo de 8.5 - 8, < 8 - 7.5 y < 7.5 - ≤ 7 se asociaron con frecuentes, medios y escasos síntomas del ataque por *P. omnivora* hacia plantas de algodón *Gossypium* spp., respectivamente (Bell, 1990). Los esclerocios de este hongo fueron más susceptibles a *Trichoderma* sp. y Propiconazol a pH 4 - 5 que a pH 7; sin embargo, los esclerocios modificaron el pH desde 3.6 - 3.8 a 5.0 - 5.5 después de permanecer en soluciones de ácido acético (Samaniego- Gaxiola, 2008 a). De manera indirecta, el pH ácido podría afectar la patogenicidad de *P. omnivora*, pues se redujo el número de plantas de vid con síntomas de ataque del hongo después de aplicar al suelo el fertilizante ácido tiosulfato de amonio durante 10 años (Olsen *et al.*, 1988).

La humedad, temperatura y pH en su conjunto, indujeron en especies de *Fusarium* y *Sclerotium* consumo de energía y la pérdida de su supervivencia (Hyakumachi y Luckwood, 1989; Mondal y Hyakumachi, 1998). El pH de la solución del suelo decae al degradar la materia orgánica en ausencia de oxígeno, aparecen ácidos grasos volátiles como el acético y mueren los microorganismos fitopatógenos (Momma, 2008). Así que, se aume que la muerte de estos microorganismos se debe en parte a los ácidos grasos volátiles (Momma *et al.*, 2006). Pero no se sabe si ácidos inorgánicos en soluciones diluidas como el sulfúrico, pudiesen matar hongos fitopatógenos, particularmente esclerocios de *P. omnivora*.

El modificar temporalmente el pH del suelo podría disminuir el inóculo de hongos fitopatógenos como *P. omnivora*; sin embargo, antes de intentar un cambio temporal del pH del suelo, es necesario determinar si éste afecta la supervivencia

treatments had a synergistic effect of reducing the survival of sclerotia that had been previously placed in the selected solutions (0.5 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid and buffer with pH 5 diluted 1:10).

**Key words:** organic matter, phytopathogenic fungi in soil, volatile fatty acids.

## Introduction

*Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert appears mainly in alkaline soils, attacks the roots of more than 2 000 plant species and is found only in Mexico and the United States of America (Uppalapati *et al.*, 2010). The soil pH ranges of 8.5 - 8, <8 - 7.5 and <7.5 - = 7 were associated with frequent medium and scarce symptoms, respectively of the attack of *P. omnivora* to cotton plants *Gossypium* spp. (Bell, 1990). The sclerotia of this fungus were more susceptible to *Trichoderma* sp. and Propiconazole at a pH 4 - 5 than at pH 7; however, the sclerotia modified the pH from 3.6 - 3.8 to 5.0 - 5.5 after remaining in acetic acid solutions (Samaniego-Gaxiola, 2008 a). Indirectly, an acid pH may affect the pathogenicity of *P. omnivora*, as the number of vine plants with fungus attack symptoms was reduced after applying a fertilizer containing ammonium thiosulfate to the soil for 10 years (Olsen *et al.*, 1988).

Together, humidity, temperature and pH induced energy consumption and loss of survival in *Sclerotium* *Fusarium* species (Hyakumachi and Luckwood, 1989; Mondal and Hyakumachi, 1998). The pH of the soil solution descends when organic matter is degraded in the absence of oxygen; volatile fatty acids such as acetic acid appear and phytopathogenic microorganisms die (Momma, 2008). Thus, it is assumed that the death of these microorganisms is partly due to volatile fatty acids (Momma *et al.*, 2006). But it is unknown whether dilute inorganic acids such as sulfuric acid could kill pathogenic fungi, particularly the sclerotia of *P. omnivora*.

Temporarily modifying soil pH may decrease the inoculum of phytopathogenic fungi such as *P. omnivora*, but before attempting a temporary change in soil pH, it is necessary to determine whether this affects the survival of fungal sclerotia. A controlled change of pH is technically more easily done in vitro than in the soil, since soil pH is dynamic and depends and interacts with the organic matter content,

de los esclerocios del hongo. Un cambio controlado de pH es técnicamente más fácil hacerlo *in vitro* que en el suelo, ya que el pH del suelo es dinámico, depende e interacciona con el contenido de materia orgánica, fertilizantes, sales, humedad, actividad microbiana y raíces de plantas (Imas, 2000; Sahrawat, 2005). Por tanto, *in vitro*, es factible estudiar la capacidad de los esclerocios de *P. omnivora* para cambiar el pH de su entorno inducido con ácidos orgánico e inorgánico. Asimismo, sería posible determinar la respuesta en supervivencia de los esclerocios al verse restringidos a cambiar el pH de su entorno, ello usando soluciones amortiguadoras o recambios de soluciones ácidas donde los esclerocios permanezcan.

En suma, el pH podría ser un factor de estrés que induzca la muerte de los esclerocios de *P. omnivora*. Factores de estrés como el NaOCl, suelo adicionada con glucosa y humedad en suelo se han estudiado para los esclerocios de *P. omnivora* (Samaniego-Gaxiola, 1992; 1994; 2008 b), pero no se ha estudiado la posible interacción entre éstos factores y el pH. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) registrar el cambio de pH causado por esclerocios de *P. omnivora* en soluciones de ácidos acético, sulfúrico y amortiguadoras; 2) determinar la supervivencia de los esclerocios después de permanecer en cada una de estas soluciones; y 3) evaluar la supervivencia de los esclerocios después de permanecer en soluciones selectas ácidas o amortiguadoras y posteriormente, someterlos a los siguientes tratamientos de estrés: enterrados en arena inundada y adicionada con glucosa, inmersos en una solución de hipoclorito de sodio, enterrados en arena inundada, y enterrados en arena a capacidad de campo.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Esclerocios de *P. omnivora* se reprodujeron durante dos meses en frascos con arena y sorgo estéril, se cosecharon y finalmente se almacenaron a 10 °C inmersos en agua destilada estéril hasta su uso, como se indica en Samaniego-Gaxiola (2008 a). Los experimentos iniciaron 10 días después obtener los esclerocios. Grupos de 25 esclerocios se colocaron por vial de 20 ml que contenía 10 mL de la solución ácida o amortiguadora a evaluar. Cada vial representó una de las cuatro repeticiones por tratamiento en los experimentos.

with fertilizers, salt, moisture, microbial activity and plant roots (Imas, 2000; Sahrawat, 2005). Therefore, it is possible to study *in vitro* the ability of the sclerotia of *P. omnivora* to change the pH of their environment, inducing it with organic and inorganic acids. It would also be possible to determine the survival response of sclerotia when their ability to change the pH of their environment is restricted by placing them in buffer or acid replacement solutions.

In sum, the pH may be a stress factor that induces the sclerotia of *P. omnivora* to die. Stress factors for the sclerotia of *P. omnivora* such as NaOCl, soil supplemented with glucose and soil moisture have been studied (Samaniego-Gaxiola, 1992; 1994; 2008 b), but the possible interaction between these factors and the pH has not been studied. The objectives of this study were: 1) to record the pH change caused by the sclerotia of *P. omnivora* in acetic acid, sulfuric acid and buffer solutions; 2) to determine the survival of sclerotia after remaining in each of these solutions; and 3) to evaluate the survival of sclerotia after remaining in selected acidic or buffer solutions, and, subsequently, to subject the surviving sclerotia to the following stress treatments: bury them in sand saturated with glucose; immerse them in a solution of sodium hypochlorite; bury them in flooded sand and in sand at field capacity.

## Materials and methods

### Biological material

Sclerotia of *P. omnivora* reproduced during two months in flasks with sand and sterile sorghum; they were then harvested and finally stored at 10 °C immersed in sterile distilled water until use, as described in Samaniego-Gaxiola (2008 a). Experiments began 10 days after obtaining the sclerotia. Groups of 25 sclerotia were placed in a 20 ml vial containing 10 mL of the acidic or buffer solution which was to be evaluated. Each vial represented one of the four repetitions per treatment in the experiments.

### Chemical solutions

Acetic and sulfuric acid solutions were prepared at a ratio of 0.4, 0.8 and 1.7, or 0.25, 0.5 and 1 mmol L<sup>-1</sup>, respectively. Buffer solutions with pH 4 and 5 were prepared using 0.2 M acetic acid - sodium acetate. In the solution with pH 8, 0.2 M of potassium hydroxide - dibasic sodium phosphate were

## Soluciones químicas

Soluciones de ácidos acético y sulfúrico fueron preparadas a razón de 0.4, 0.8 y 1.7 ó 0.25, 0.5 y 1 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Soluciones amortiguadoras de pH 4 y 5 se prepararon usando 0.2 M de ácido acético - acetato de sodio. En la solución de pH 8, se uso 0.2 M de hidróxido de potasio - fosfato de sodio dibásico. Para la solución de pH 9, se emplearon 0.1 M de bicarbonato de sodio - carbonato de sodio (Plummer, 1981). Las soluciones amortiguadoras se usaron sin diluir (1:0) o diluidas en agua destilada en proporción de 1:2, 1:4 y 1:10 v/v. Como control, a todas las soluciones preparadas se le verificó el pH (pH observado) y fue comparado con el pH calculado según las siguientes ecuaciones: para el ácido acético  $pH = (1/2 * pK) - (1/2) * \log_{10}(c)$ , en donde pK y c son la constante de disociación y moles por litro del ácido, respectivamente (Tenuta *et al.*, 2002); entre tanto, para el ácido sulfúrico el  $pH = -\log_{10}(c)$  donde c son moles por litro del ácido. Los resultados del pH de las soluciones se indican en el siguiente cuadro.

**Cuadro 1. pH calculado (pH C) u observado (pH O) en las soluciones de ácidos acético y sulfúrico a distintas concentraciones (mmol L<sup>-1</sup>); y pH de las soluciones amortiguadoras preparadas a pH 4, 5, 8, y 9 según el factor de dilución en agua destilada v/v (DF).**

**Table 1. Calculated (pH C) or observed (pH O) pH in the acetic and sulfuric acid solutions at different concentrations (mmol L<sup>-1</sup>); and pH of the buffer solutions prepared with pH 4, 5, 8, and 9 according to the dilution factor in distilled water v/v (DF).**

Ácido acético			Ácido sulfúrico			Soluciones amortiguadoras				
mmol L <sup>-1</sup>	pH C	pH O	mmol L <sup>-1</sup>	pH C	pH O	DF	pH 4	pH 5	pH 8	pH 9
0.4	4.08	4.09	0.25	3.60	3.68	1:0	4.02	4.99	7.91	9.01
0.8	3.93	3.80	0.5	3.30	3.14	1:2	3.99	4.96	7.86	8.93
1.7	3.76	3.63	1.0	3.00	2.87	1:4	3.93	4.92	7.78	8.84
						1:10	3.95	4.99	7.66	8.69

## Incubación y supervivencia de los esclerocios en las soluciones ácidas y amortiguadoras

Los esclerocios fueron incubados por 14 días a temperatura de 28 °C en viales que contenían 10 mL de las soluciones de los ácidos acético (0.4, 0.8 y 1.7 mmol L<sup>-1</sup>) y sulfúrico (0.25, 0.5 y 1 mmol L<sup>-1</sup>), en el tratamiento testigo se incubaron los esclerocios en viales con agua destilada. Otros esclerocios fueron incubados en las soluciones ácidas señaladas, pero las soluciones de los ácidos se cambiaron una, dos o tres veces; el primer cambio fue al tercer, el segundo al

used. For the solution with pH 9, 0.1 M of sodium bicarbonate - sodium carbonate was used (Plummer, 1981). The buffer solutions were used undiluted (1:0) or diluted in distilled water in proportions of 1:2, 1:4 and 1:10 v/v. For control, the pH of all the prepared solutions was checked (observed pH) and compared with the pH calculated according to the following equations: for acetic acid,  $pH = (1/2 * pK) - (1/2) * \log_{10}(c)$ , where pK and c are the dissociation and moles per liter constants, respectively (Tenuta *et al.*, 2002); for sulfuric acid,  $pH = -\log_{10}(c)$ , where c are moles per liter of acid. The results of the pH of the solutions are indicated in Table 1.

## Incubation and survival of sclerotia in acidic and buffer solutions

The sclerotia were incubated for 14 days at 28 °C in vials containing 10 mL of acetic (0.4, 0.8 and 1.7 mmol L<sup>-1</sup>) and sulfuric acid solutions (0.25, 0.5 and 1 mmol L<sup>-1</sup>); for

the control treatment the sclerotia were incubated in vials with distilled water. Other sclerotia were incubated in the mentioned acidic solutions, but the acid solutions were replaced one, two or three times; the first replacement was made on the first third day, the second on the sixth day and the third on the ninth day after starting the incubation period. Additional sclerotia were incubated in undiluted (1:0 with pH 4, 5, 8 and 9) or diluted (1:2, 1:4 and 1:10) buffer solutions for seven days at 28 °C. After incubating the sclerotia in acidic or buffer solutions, their survival was assessed by placing them on sand at

sexto y el tercer al noveno día después de iniciar el período de incubación. Esclerocios adicionales se incubaron en soluciones amortiguadoras sin diluir (1:0 a pH 4, 5, 8 y 9) o diluidas (1:2, 1:4 y 1:10) durante siete días a 28 °C. Después de incubar los esclerocios en las soluciones ácidas o amortiguadoras, se evaluó su supervivencia al colocarlos sobre arena a capacidad de campo contenida en cajas petri, por dos semanas a 28 °C. Durante este tiempo, se observó la germinación de los esclerocios (viables) o su invasión y muerte por otros microorganismos del suelo (no viables) (Samaniego-Gaxiola, 2008 a).

### **Incubación y supervivencia de los esclerocios en soluciones selectas y posteriores tratamientos**

Se colocaron esclerocios en soluciones de 0.5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico y amortiguadora pH 5 diluida 1:10, en cuyos casos respectivos, permanecieron incubados por 3, 10 ó 13 y uno, tres o seis días a 28 °C. Después de incubar los esclerocios, éstos se extrajeron y se les aplicó los tratamientos siguientes: 1) se enterraron durante dos semanas a 28 °C en arena inundada y adicionado con 1 mg g<sup>-1</sup> de glucosa (Samaniego-Gaxiola, 1994); 2) se colocaron en viales que contenían 10 mL de solución de hipoclorito de sodio comercial al 0.3% por 4 h a 28 °C (Samaniego-Gaxiola, 2008 b); 3) se enterraron en arena inundada por dos semanas a 28 °C (Samaniego-Gaxiola, 1992); y 4) se enterraron dos semanas en arena cuya humedad inicial fue capacidad de campo. Después de cada tratamiento, los esclerocios se extrajeron y se evaluó su supervivencia en arena, excepto para los esclerocios en NaOCl, en cuyo caso se colocaron en medio agar agua (15 g de agar por litro), por una semana a 28 °C (Samaniego-Gaxiola, 1994 y 2008 b).

### **Monitoreo del pH en las soluciones**

El pH se midió con un potenciómetro marca Orion y modelo 710 A. En las soluciones de los ácidos acético y sulfúrico donde permanecieron los esclerocios se midió el pH a los 1, 3, 6, 9, y 12 días; en estas soluciones las mediciones de pH a los 3, 6 y 9 días se realizaron justo antes de hacer cada recambio de los ácidos. El pH en las soluciones amortiguadoras se midió a los 1, 3, 5 y 7 días.

### **Análisis de datos**

Todos los experimentos se repitieron dos veces. Los datos de los experimentos repetidos por segunda vez fueron los que se analizaron, debido a su menor desviación estándar de las

field capacity contained in Petri dishes for two weeks at 28 °C. During this time, the germination of sclerotia (viable), or their invasion and death by other soil microorganisms (non-viable) was observed (Samaniego-Gaxiola, 2008 a).

### **Incubation and survival of sclerotia in selected solutions and subsequent treatments**

Sclerotia were placed in solutions of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> of sulfuric acid and in buffer solutions with pH 5 diluted 1:10, and remained incubating for 3, 10 or 13 and one, three or six days at 28 °C, respectively. After incubating the sclerotia, they were removed and the following treatments were applied: 1) buried during two weeks at 28 °C in flooded sand with 1 mg<sup>-1</sup> g of glucose (Samaniego-Gaxiola, 1994); 2) placed in vials containing 10 mL of 0.3% commercial sodium hypochlorite solution for 4 h at 28 °C (Samaniego-Gaxiola, 2008 b); 3) buried in flooded sand for two weeks at 28 °C (Samaniego - Gaxiola, 1992); and 4) buried for two weeks in sand with initial moisture at field capacity. After each treatment, the sclerotia were extracted and their survival in sand evaluated, except for the sclerotia in NaOCl, which were placed in water agar medium (15 g of agar per liter) for one week at 28 °C (Samaniego-Gaxiola, 1994 and 2008 b).

### **Monitoring of pH in the solutions**

The pH was measured with an Orion potentiometer model 710 A. In the solutions of sulfuric and acetic acids in which the sclerotia remained, pH was measured at 1, 3, 6, 9, and 12 days; in these solutions pH measurements at 3, 6 and 9 days were conducted just before replacing the acids. The pH of the buffer solutions was measured at 1, 3, 5 and 7 days.

### **Data analysis**

All experiments were repeated twice. Data from the experiments repeated a second time were analyzed, due to their lower standard deviation of the mean. The survival percentage of sclerotia were transformed (arcsin) before statistical analysis. Each experiment was managed with a completely randomized design, a factorial arrangement and an ANOVA with means repeated over time. The Tukey test was used to compare means ( $p=0.05$ ). All analyzes were conducted in SAS (1999).

medias. Los porcentajes de supervivencia de los esclerocios se transformaron (arco seno) antes del análisis estadístico. Cada experimento se manejó con un diseño completamente al azar, un arreglo factorial y un análisis de varianza con medias repetidas a través del tiempo. La prueba de Tukey fue usada para comparar medias ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis se efectuaron en SAS (1999).

## Resultados

### Monitoreo del pH en las soluciones

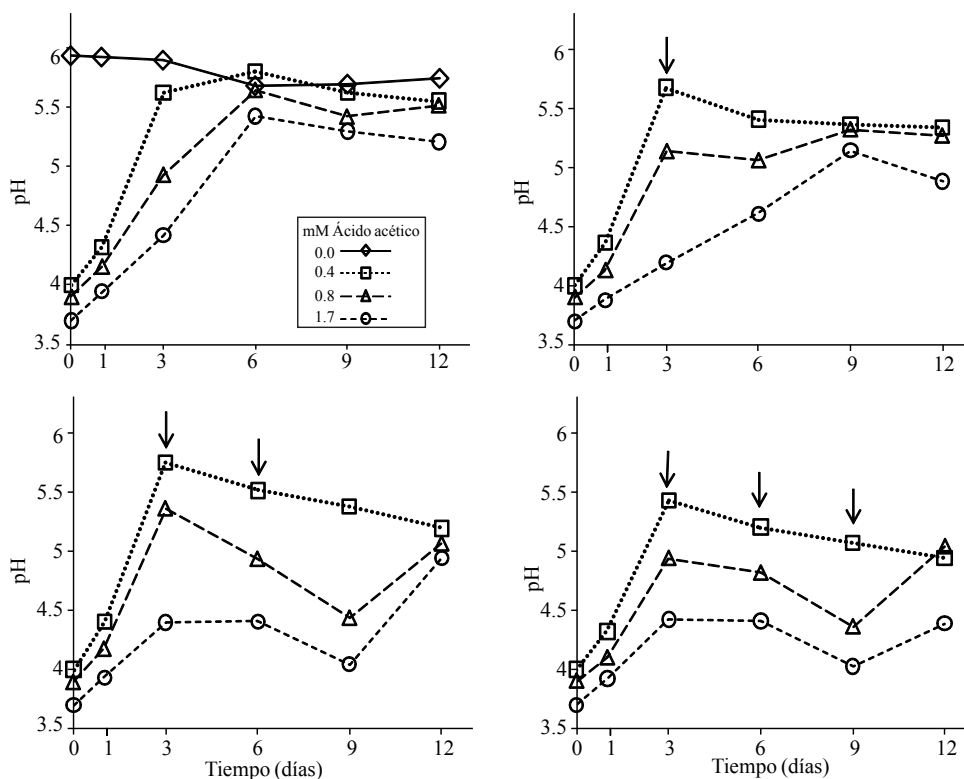
En solución de ácido acético sin recambio a  $1.7 \text{ mmol L}^{-1}$  donde permanecieron los esclerocios, el pH alcanzó  $\sim 5.5$  hacia el sexto y se mantuvo así hasta el doceavo día; en contraste, en solución a la misma concentración con tres recambios, el pH se mantuvo 4.0-4.4 (Figura 1). El cambio de pH de las soluciones de ácido acético, dependió de los recambios, el tiempo, la concentración del ácido y sus interacciones ( $p \leq 0.001$ ).

## Results

### Monitoring of pH in the solutions

In an acetic acid solution without replacement at  $1.7 \text{ mmol L}^{-1}$  where the sclerotia remained, the pH reached  $\sim 5.5$  by the sixth day and remained so until the twelfth day; in contrast, in a solution with the same concentration and with three replacements, the pH remained constant at 4.0-4.4 (Figure 1). The change of pH in the solutions of acetic acid depended on the replacements, the time, the acid concentration and their interaction ( $p = 0.001$ ).

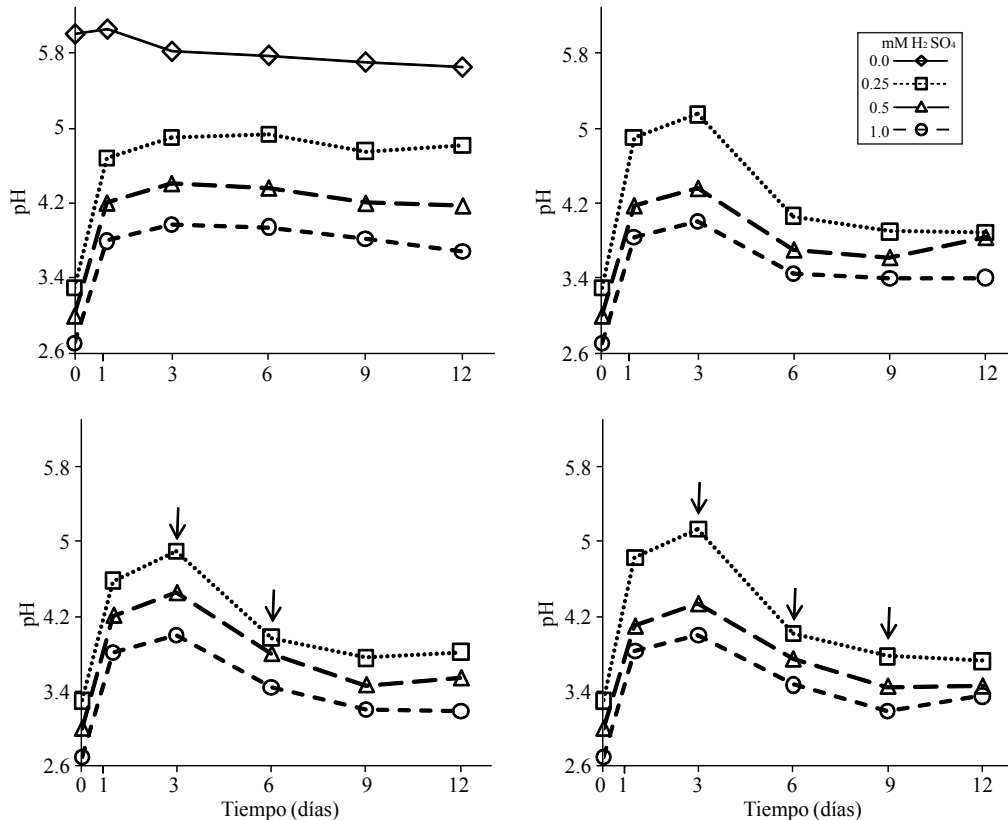
Sclerotia immersed for 12 days in a sulfuric acid solution at 0.25, 0.5 and  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  without replacement had a pH of between 4.8 and 3.6; meanwhile, the pH remained at 3.6 to 3.4 in all solutions of sulfuric acid with three replacements (Figure 2). In sulfuric acid solutions without replacement, the change in pH with respect to time and the interactions between the two were not significant, but they were significant with respect to the acid concentration ( $p = 0.001$ ).



**Figura 1. Cambio de pH en soluciones de ácido acético donde los esclerocios de *P. omnivora* permanecieron a  $28^\circ\text{C}$ ,  $n = 4$ . Las soluciones no se recambiaran o se hicieron una, dos o tres veces. Las flechas indican el día de cada recambio.**

**Figure 1. Change of pH in acetic acid solutions where the sclerotia of *P. omnivora* stayed at  $28^\circ\text{C}$ ,  $n = 4$ . The solutions were not replaced, or were made one, two or three times. The arrows indicate the day of each replacement.**

Esclerocios inmersos 12 días en solución de ácido sulfúrico a 0.25, 0.5 y 1 mmol L<sup>-1</sup> sin recambio tuvieron un pH entre 4.8 a 3.6; mientras tanto, el pH se mantuvo 3.6 a 3.4 en todas las soluciones de ácido sulfúrico con tres recambios (Figura 2). En las soluciones sin recambio de ácido sulfúrico, el cambio en el pH con relación al tiempo y sus interacciones no fueron significativas, pero fue significativo para la concentración del ácido ( $p \leq 0.001$ ).



**Figura 2.** Cambio de pH en soluciones de ácido sulfúrico donde los esclerocios de *P. omnivora* permanecieron a 28 °C, n=4. Las soluciones no se recambiaron o se hicieron una, dos o tres veces. Las flechas indican el día de cada recambio.

**Figure 2.** Change of pH in the sulfuric acid solutions where the sclerotia of *P. omnivora* stayed at 28 °C, n=4. The solutions were not replaced, or were made one, two or three times. The arrows indicate the day of each replacement.

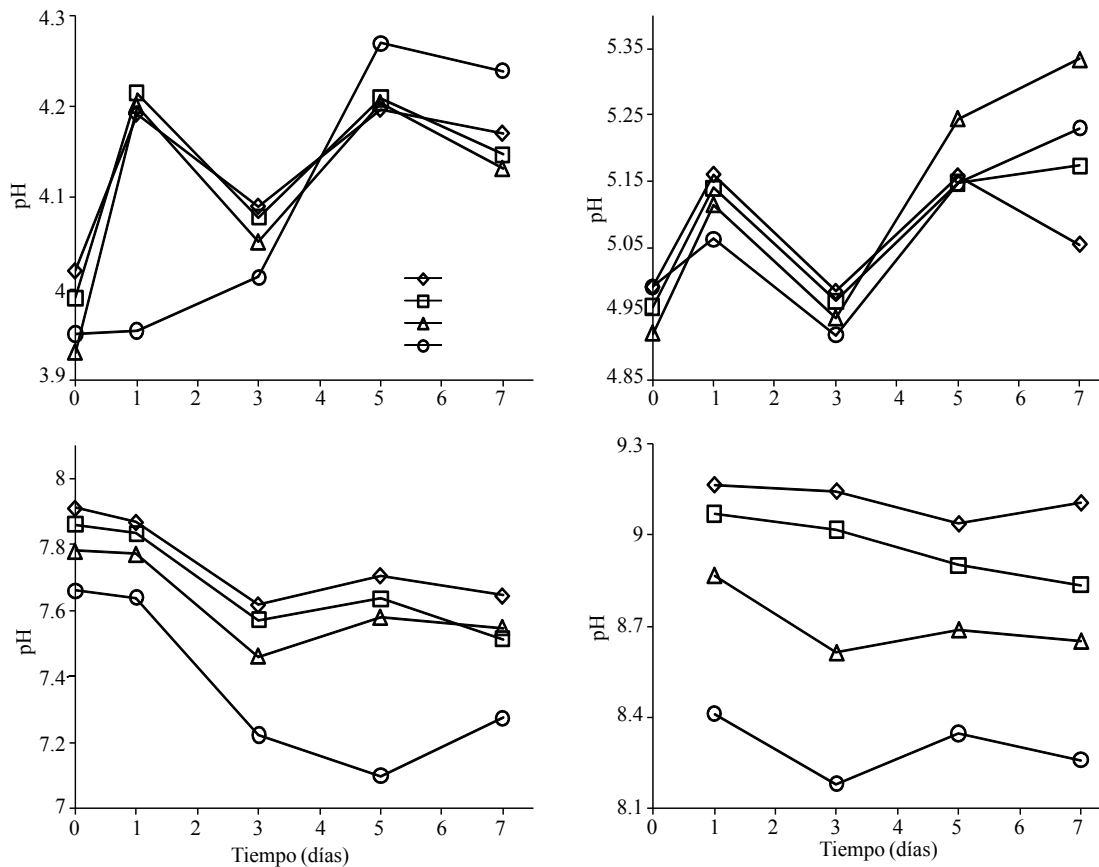
Las soluciones amortiguadoras sin diluir, donde estuvieron los esclerocios, se mantuvieron sin cambio de pH a través del tiempo; pero al diluir 1:10 las soluciones amortiguadoras de pH 8 y 9, se observó un cambio de pH hasta de una unidad. Mientras tanto, la variación o bservada en el pH en soluciones amortiguadora de pH 4 y 5 diluidas 1:10 sólo varió ~0.3 unidades (Figura 3). Los cambios de pH en las soluciones amortiguadoras de pH 4, 5, 8 y 9 fueron significativos con relación al factor de dilución, tiempo y su interacción ( $p=0.01$ ), excepto a pH 9, donde la interacción tiempo x factor de dilución no fue significativa.

The undiluted buffer solutions in which the sclerotia were placed showed no change in pH over time; but when the buffer solutions with pH 8 and 9 were diluted 1:10, there was a change in pH of up to a unit. Meanwhile, the observed variation in pH in buffer solutions with pH 4 and 5 diluted 1:10 only varied ~0.3 units (Figure 3). The pH changes in the buffer solutions with pH 4, 5, 8 and 9 were significant with respect to the dilution factor, the time and their interaction ( $p=0.01$ ), except at pH 9, wherein the interaction between time and dilution factor was not significant.

### Survival of sclerotia in acidic solutions and buffers

All sclerotia survived in all acetic and sulfuric acid solutions without replacement, but their survival began to decline in the solutions of 0.5 and 1 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid with three or one replacement, respectively (Table 2). In sulfuric acid solutions, the survival of sclerotia varied with respect to the concentration and the replacements ( $p=0.001$ ).

In undiluted buffer solutions with pH 8 and 9 the survival of sclerotia was <25%, but the sclerotia survived almost completely when these solutions were diluted. The sclerotia



**Figura 3. Cambio de pH en soluciones amortiguadoras donde permanecieron los esclerocios de *P. omnivora* a 28 °C. n= 4. Las soluciones diluidas o no inicialmente tuvieron un pH de 4, 5, 8 y 9.**

**Figure 3. Change of pH in buffer solutions where the sclerotia of *P. omnivora* stayed at 28 °C. n= 4. The solutions, diluted or not, had initially a pH of 4, 5, 8 and 9.**

### Supervivencia de los esclerocios en las soluciones ácidas y amortiguadoras

Todos los esclerocios sobrevivieron en todas las soluciones de ácidos acético y sulfúrico sin recambio, pero, su supervivencia empezó a disminuir en las soluciones de 0.5 y 1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico con tres o un recambio, respectivamente (Cuadro 2). En las soluciones de ácido sulfúrico la supervivencia de los esclerocios varió con respecto a la concentración y los recambios ( $p \leq 0.001$ ).

A pH 8 y 9 en soluciones amortiguadora sin diluir, la supervivencia de esclerocios fue <25%, pero los esclerocios sobrevivieron casi por completo cuando estas soluciones se diluyeron. Los esclerocios no sobrevivieron en cualquier solución amortiguadora a pH 4 y sobrevivieron sólo 24% en solución diluida 1:10 a pH 5 (Cuadro 3).

did not survive in any buffer solution with pH 4, and only 24% survived in a buffer solution with pH 5 diluted 1:10 (Table 3).

### Survival of sclerotia in selected solutions and subsequent treatments

The sclerotia did not survive after remaining in a solution of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid for 7 or 10 days and then being placed in a solution of NaOCl or buried in flooded sand containing glucose, respectively. By contrast, almost 100% sclerotia survived after 7 days of staying in a sulfuric acid solution and then being buried in sand: flooded with glucose, at field capacity or flooded (Table 4).

The survival of sclerotia decreased by increasing their staying time in 0.5 mmol L<sup>-1</sup> sulfuric acid solutions and in buffer solutions with pH 5 diluted 1:10, and then subjecting



**Cuadro 2. Porcentaje de supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* después 14 días, a 28 °C, en soluciones de ácido sulfúrico que se cambiaron.****Table 2. Survival percentage of the sclerotia of *P. omnivora* after 14 days at 28 °C in replaced sulfuric acid solutions.**

mmolL <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Núm. de cambios del ácido †			
	Cero	Uno	Dos	Tres
0.25	100 a¶	100 a	100 a	100 a
0.5	100 a	100 a	100 a	32 c
1.0	100 a	71 b	7 d	0 d

† Las soluciones se cambiaron cero, una, dos o tres veces a los 0, 3, 3 y 6 o 3, 6 y 9 días, respectivamente. ¶ Valores con diferente letra son estadísticamente distintos, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 3. Porcentaje de supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* después de 7 días, a 28 °C en soluciones amortiguadoras sin diluir o diluidas.****Table 3. Survival percentage of the sclerotia of *P. omnivora* after 7 days at 28 °C in buffer solutions, diluted or undiluted.**

Factor de dilución	pH de las soluciones amortiguadoras			
	4	5	8	9
(sin diluir)	0 c¶	0 c	24 b	0 c
1:2	0 c	0 c	97 a	100 a
1:4	0 c	0 c	100 a	100 a
1:10	0 c	26 b	100 a	100 a

¶ Valores con diferente letra son estadísticamente distintos, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Supervivencia de los esclerocios en soluciones selectas y posteriores tratamientos**

Los esclerocios no lograron sobrevivir después de permanecer en solución 0.5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico durante 7 ó 10 días y posteriormente colocarse en solución de NaOCl o enterrarse en arena inundada que contenía glucosa, respectivamente. Por el contrario, los esclerocios sobrevivieron casi 100% después de 7 días de permanecer en la solución de este ácido y posteriormente enterrarlos en arena: inundada con glucosa, a capacidad de campo o inundada (Cuadro 4).

them to stress treatments; the order in which it happened was: NaOCl> sand with glucose> flooded sand> sand at field capacity (Tables 4 and 5).

**Discussion**

The most pronounced changes in pH were observed after the sclerotia remained in the less concentrated solutions of acetic and sulfuric acid solutions, and in buffer solutions diluted 1:10. When sulfuric acid was replaced and undiluted

**Cuadro 4. Porcentaje de supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* después de permanecer (días) en solución de 0.5 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico, y posteriormente aplicarles algún tratamiento.****Table 4. Survival percentage of sclerotia of *P. omnivora* after staying (days) in a solution of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> of sulfuric acid, and subsequently undergoing a treatment.**

Días	Tratamientos †			
	Arena a capacidad de campo	Arena inundada adicionada con glucosa	Solución de NaOCl	Arena inundada
7	100 a¶	91 a	0 d	94 a
10	74 b	0 d	0 d	100 a
13	14 c	0 d	0 d	41 c

† Ver detalles en texto de tratamientos. ¶ Valores con diferente letra son estadísticamente distintos, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Al incrementar el tiempo de permanencia de los esclerocios en las soluciones de ácido sulfúrico 0.5 mmol L<sup>-1</sup> y amortiguadora a pH 5 diluida 1:10, y posteriormente someterlos a tratamientos de estés, su supervivencia disminuyó, el orden en que ello ocurrió fue: NaOCl > arena con glucosa > arena inundada > arena a capacidad de campo (Cuadros 4 y 5).

buffer solutions were used, the pH of these solutions was little changed, and the survival of the sclerotia decreased. This indicates that the highly acidic pH is a factor that reduces the in vitro survival of the sclerotia of *P. omnivora*, which could also occur in acidic soils, and is an indication of why the fungus does not manifest itself attacking plants in acid pH soils.

**Cuadro 5. Porcentaje de supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* después de permanecer (días) en solución amortiguadora de pH 5 diluida 1:10, y posteriormente aplicarles algún tratamiento.**

**Table 5. Survival percentage of sclerotia of *P. omnivora* after staying (days) in a buffer solution with pH 5 diluted 1:10, and subsequently undergoing a treatment.**

Días	Tratamientos †			
	Arena a capacidad de campo	Arena inundada adicionada con glucosa	Solución de NaOCl	Arena inundada
1	100 a	96 a	79 b	100 a
3	98 a	71 b	48 c	100 a
6	76 b	0 d	0 d	100 a

† Ver detalles en texto de tratamientos. ‡ Valores con diferente letra son estadísticamente distintos, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## Discusión

Los cambios de pH más acentuados se observaron después de que los esclerocios permanecieron en las soluciones menos concentradas de los ácidos acético, sulfúrico y soluciones amortiguadoras diluidas 1:10. Cuando el ácido sulfúrico se recambió y se usaron soluciones amortiguadoras no diluidas, el pH en estas soluciones tuvo poco cambio y los esclerocios disminuyeron su supervivencia. Esto indica que el pH muy ácido es un factor que disminuye in vitro la supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora*, lo que podría también ocurrir en suelos ácidos, y es un indicio del por qué el hongo no se manifiesta atacando plantas en suelos con pH ácido.

Los suelos ácidos favorecen la biodiversidad de hongos; sin embargo, los hongos tienen un amplio margen de crecimiento con relación al pH (4.0-8.3) y se encuentran menos en suelo alcalino debido a la competencia con las bacterias (Fierer y Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010). En general, *P. omnivora* parece romper ésta regla, pues preponderantemente se encuentra en los suelos alcalinos de Estados Unidos de América y México (Uppalapati *et al.*, 2010).

Los hongos pueden alcalinizar el pH de su entorno al producir amoníaco (Prusky *et al.*, 2001), pero al mismo tiempo necesitan una autorregulación de ese pH y de sus

Acid soils favor the biodiversity of fungi; however, fungi have a wide margin of growth with respect to pH (4.0-8.3), and are less frequent in alkaline soils due to competition with bacteria (Fierer and Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010). In general, *P. omnivora* seems to break this rule, as it is found predominantly in the alkaline soils of the United States of America and Mexico (Uppalapati *et al.*, 2010).

Fungi can alkalize the pH of their environment by producing ammonia (Prusky *et al.*, 2001), but they also require self-regulation of pH and of their intracellular solutes, which they can achieve by producing organic acids and the exit of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> ions through the use of energy (ATP) (Russel, 1992; Caracuel *et al.*, 2003). Therefore, the external pH stimulates fungi so that they in turn change it; however, there is no information on how the sclerotia of *P. omnivora* regulate the internal and external pH.

The pH around the fungi also induces the expression of their genes, which code for: the change of extracellular pH (up to four units); the formation of secondary metabolites; the excretion of enzymes; the permeability of their cell walls; and for attacking plants; for this reason, manipulating the pH of the soil or water environment could help combat the fungi that attack plants, animals and men (Eshel *et al.*, 2002; Peñalva and Arst, 2002). Particularly, acetic acid and other volatile fatty acids penetrate the fungal cells and induce

solutos intracelulares, lo cual pueden lograrlo al producir ácidos orgánicos y la salida de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  mediante el uso de energía (ATP) (Russel, 1992; Caracuel *et al.*, 2003). Por tanto, el pH externo estimula a los hongos para que ellos a su vez lo modifiquen; sin embargo, no hay información de cómo regula el pH externo e interno los esclerocios de *P. omnivora*.

El pH alrededor de los hongos también induce la expresión de sus genes que codifican para: el cambio del pH extracelular (hasta cuatro unidades), la formación de metabolitos secundarios, la excreción de enzimas, la permeabilidad su pared celular y para atacar a plantas, por ello, manipular el pH del ambiente suelo o agua podría contribuir a combatir hongos que atacan a plantas, animales y al hombre (Eshel *et al.*, 2002; Peñalva y Arst, 2002). Particularmente, el ácido acético y otros ácidos grasos volátiles penetran a las células de hongos e inducen degradación de ADN y cambio de pH intracelular (Giannattasio *et al.*, 2012), ello podría también ocurrir cuando los esclerocios mueren en las soluciones amortiguadoras, como se consigna en este trabajo.

El ácido acético en forma no ionizada tiene un efecto tóxico muy acentuado sobre células, aunque también es tóxico en forma ionizada (Wang y Wang, 1984; Fernández-Sandoval *et al.*, 2010). La forma no ionizada del ácido se realza al disminuir el pH, lo que hace que penetre a las células e induzca su muerte (Uhre y Arneborg, 1998). En este trabajo, la supervivencia de los esclerocios disminuyó en las soluciones amortiguadoras diluidas  $\leq 1:10$  a pH 5 cuyo contenido de ácido acético fue  $\geq 6.4 \text{ mmol L}^{-1}$ , que es en realidad equivale a  $2.1 \text{ mmol L}^{-1}$  del ácido en forma no ionizada, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch citada por Tenuta *et al.* (2002). En contraste, todos los esclerocios sobreviven hasta dos semanas en soluciones de  $1.7 \text{ mmol L}^{-1}$  o ( $1.4 \text{ mmol L}^{-1}$  ácido en forma no ionizada).

Dosis de ácido acético de 17 o  $67 \text{ mmol L}^{-1}$  donde permanecieron esclerocios de *P. omnivora* murieron en  $> 70\%$  después de cinco horas o 15 minutos, respectivamente (Samaniego-Gaxiola, 2010). Lo anterior, sugiere que el efecto letal del ácido acético sobre los esclerocios de *P. omnivora* se debe al ácido en sí y no al pH inducido por éste ácido. Esta idea es apoyada también, por la supervivencia por completo de los esclerocios que permanecieron dos semanas en la solución de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico con un pH  $\sim 3.6$  (Cuadro 2).

El ácido sulfúrico podría inducir la muerte de los esclerocios al reaccionar directamente con los compuestos celulares, ya que él ácido es sumamente reactivo. De

DNA degradation and intracellular pH change (Giannattasio *et al.*, 2012); this could also occur when the sclerotia die in the buffer solutions, as is recorded in this work.

Non-ionized acetic acid has a very marked toxic effect on cells, but it is also toxic in ionized form (Wang and Wang, 1984; Fernández-Sandoval *et al.*, 2010). The non-ionized form of the acid is heightened when the pH decreases, which causes it to penetrate the cells and induce their death (Uhre and Arneborg, 1998). In this work, the survival of sclerotia decreased in diluted buffer solutions with pH 5 diluted 1:10, the acetic acid content of which was  $= 6.4 \text{ mmol L}^{-1}$ , which is equivalent to  $2.1 \text{ mmol L}^{-1}$  of the acid in non-ionized form, according to the Henderson-Hasselbalch equation cited by Tenuta *et al.* (2002). In contrast, all sclerotia survived up to two weeks in solutions of  $1.7 \text{ mmol L}^{-1}$  of acetic acid (or  $1.4 \text{ mmol L}^{-1}$  of acetic acid in non-ionized form).

When staying in a dose of 17 or  $67 \text{ mmol L}^{-1}$  of acetic acid,  $>70\%$  of the sclerotia of *P. omnivora* died after five hours and 15 min, respectively (Samaniego-Gaxiola, 2010). This suggests that the lethal effect of acetic acid on the sclerotia of *P. omnivora* is due to the acid itself and not to the pH induced by this acid. This idea is also supported by the complete survival of the sclerotia that stayed for two weeks in the solution of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  sulfuric acid with pH  $\sim 3.6$  (Table 2). Sulfuric acid could induce the death of sclerotia by reacting directly with the cellular compounds, as this acid is highly reactive. Similarly, the NaOCl can oxidize dissolved organic compounds or can oxidize directly the cellular structure; in both cases it can induce cell death (Estrela *et al.*, 2002).

Moreover, 24 and 0% of the sclerotia of *P. omnivora* survived in undiluted buffer solutions with pH 8 and 9, respectively; these solutions contained 100 and  $93 \text{ mmol L}^{-1}$  of dibasic sodium phosphate and sodium bicarbonate. There is no explanation of why the sclerotia died with pH 8 and 9; however, it was previously reported that only 0 to 7% of the sclerotia of *Sclerotium rolfsii* Sacc survived in a solid medium containing 50 mmol of dibasic sodium phosphate and sodium bicarbonate, respectively, but this was not explained either (Punja and Grogan, 1982). The alkaline pH (8) is also a factor associated with the loss of endogenous carbon and subsequent death of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Mondal and Hyakumachi, 1998).

Other results from this study indicate that the survival of the sclerotia of *P. omnivora* decreased when, after staying in selected solutions ( $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  sulfuric acid and buffer

manera similar, el NaOCl puede oxidar los compuestos orgánicos en disolución o pueden oxidar directamente estructura celular, en ambos casos puede inducir la muerte de las células (Estrela *et al.*, 2002).

Por otra parte, los esclerocios de *P. omnivora* sobrevivieron 24 y 0% en soluciones amortiguadoras no diluidas a pH de 8 y 9, respectivamente, estas soluciones contenían 100 y 93 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de sodio dibásico y bicarbonato de sodio. No se tiene explicación del por qué murieron los esclerocios a pH 8 y 9; sin embargo, con anterioridad se reportó que los esclerocios de *Sclerotium rolfsii* Sacc únicamente sobrevivieron de 0 al 7%, en medio sólido que contenía 50 mmol de fosfato de sodio dibásico y bicarbonato de sodio, respectivamente, aunque tampoco se explicó la razón de ello (Punja y Grogan, 1982). El pH alcalino (8) también es un factor que se asoció con la pérdida de carbono endógeno y subsecuente muerte de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Mondal y Hyakumachi, 1998).

Otros resultados de éste trabajo indican que, los esclerocios de *P. omnivora* disminuyeron su supervivencia cuando posterior a permanecer en las soluciones selectas (ácido sulfúrico 0.5 mmol L<sup>-1</sup> y amortiguadora pH 5 diluida 1:10) se sometieron a tratamientos adicionales de estrés (Cuadros 4 y 5). Dicha disminución de supervivencia fue mayor que la previamente reportada para esclerocios que nos estuvieron en contacto con las soluciones de ácido sulfúrico y amortiguadora (Samaniego-Gaxiola, 1992; 1994 y 2008 b). Es decir, los tratamientos de estrés fueron sinérgicos con las soluciones selectas para disminuir la supervivencia de los esclerocios.

La glucosa en suelo, resultó ser el compuesto que más incrementó la actividad metabólica de los microorganismos en el suelo, (Aldén *et al.*, 2001). La adición de glucosa o residuos vegetales ricos en carbohidratos, seguida de inundar el suelo, favorece que los microorganismos generen ácidos grasos volátiles que son capaces de matar a hongos (Okazaki y Nose, 1986; Momma, 2008), así como un descenso del pH en el suelo, un potencial oxido reducción con valores negativos, entre otros (Sahrawat, 2005). Asimismo, la adición de ácidos grasos volátiles, también se han asociado con la muerte de microorganismos fitopatógenos (Tenuta *et al.*, 2002; Conn *et al.*, 2005; Abbasi *et al.*, 2009).

Descomponer material orgánica bajo condiciones dirigidas como inundación, residuos ricos en carbohidratos y la adición de algún ácido inorgánico, podría permitir un

solution with pH 5 diluted 1:10), they were subjected to additional stress treatments (Tables 4 and 5). This reduction of survival was greater than the one previously reported for sclerotia that were not in contact with sulfuric acid and buffer solutions (Samaniego-Gaxiola, 1992; 1994 and 2008 b). In other words, the stress treatments were synergistic with the selected solutions for decreasing the survival of sclerotia.

Soil glucose proved to be the compound that increased the most the metabolic activity of the microorganisms in the soil, (Alden *et al.*, 2001). The addition of glucose or of plant residues rich in carbohydrates, followed by flooding of the soil, favors that microorganisms generate volatile fatty acids capable of killing fungi (Okazaki and Nose, 1986; Momma, 2008), as well as a decrease of the pH in the soil, and an oxide reduction potential with negative values, among others (Sahrawat, 2005). Furthermore, the addition of volatile fatty acids has also been associated with the death of phytopathogenic microorganisms (Tenuta *et al.*, 2002; Conn *et al.*, 2005; Abbasi *et al.*, 2009).

Decomposing organic matter under directed conditions such as flooding, the presence of residues rich in carbohydrates and the addition of some inorganic acid, could allow a temporary change in the pH of the soil solution where the combination of organic (volatile fatty acids) and inorganic acids could kill the sclerotia of *P. omnivora*, as was recently suggested (Samaniego-Gaxiola, 2012). In contrast, adding organic matter to the soil as compost, crop residues and vegetable fertilizer is not always associated with the death of phytopathogenic fungi that attack the roots of cultivated plants (Bonanomi *et al.*, 2007).

## Conclusions

It was confirmed that the sclerotia of *P. omnivora* were able to change the pH of acetic acid, sulfuric acid and buffer (diluted) solutions, although the change depended on the concentration of the acids, and on their replacement in the case of the acetic and sulfuric acids.

Sulfuric acid solutions only induced the death of sclerotia when they reached values of 3.5 or less during two weeks, which required the replacement of solutions, suggesting that at pH 4 this acid could hardly decrease the survival of sclerotium in soil by itself.

cambio temporal del pH de la solución del suelo, en donde la combinación de los ácidos (grasos volátiles) e inorgánico podrían matar esclerocios de *P. omnivora*, como recientemente se sugiere (Samaniego- Gaxiola, 2012). En contraste, adicionar materia orgánica en el suelo como compostas, residuos de cosecha y abonos vegetales no siempre se asocia con la muerte de hongos fitopatógenos que atacan raíces de plantas cultivadas (Bonanomi *et al.*, 2007).

## Conclusiones

Se confirmó que los esclerocios de *P. omnivora* lograron cambiar el pH de soluciones de ácidos acético, sulfúrico y amortiguadoras (diluidas), aunque el cambio dependió de la concentración de los ácidos y sus recambios en el caso de los ácidos acético y sulfúrico.

Soluciones de ácido sulfúrico solo indujeron la muerte de los esclerocios, cuando alcanzaron valores 3.5 o menos durante dos semanas, lo cual requirió de recambiar las soluciones, lo que sugiere que a pH 4 éste ácido por si solo difícilmente podría disminuir la supervivencia del esclerocio en el suelo.

En soluciones amortiguadoras con  $> 2.1 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido acético en forma no ionizada los esclerocios perdieron por completo su supervivencia, no obstante que el pH de las soluciones oscilara de 4 a 5.

La supervivencia de los esclerocios disminuyó al aumentar el tiempo de permanencia en ácido sulfúrico  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  y solución amortiguadora pH 5 diluida 1:10, y posteriormente, aplicarles los tratamientos de estrés; el orden en que los tratamientos disminuyeron la supervivencia de los esclerocios fue: NaOCl > arena con glucosa > arena inundada y arena a capacidad de campo.

## Literatura citada

- Abbasi, P. A.; Lazarovits, G. and Jabaji-Hare, S. 2009. Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology* 99:274-281.
- Aldén, I.; Demoling, F. and Bååth, E. 2001. Method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1830-1838.
- Bell, A. A. 1990. Role of nutrition in disease of cotton. *In: management of diseases with macro- and microelements.* Engelhard, W. A. (Ed.). APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 217 p.
- Bonanomi, G.; Antignani, V.; Pane, C. and Scala, F. 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *J. Plant Pathol.* 89:311-340.
- Caracuel, Z.; Casanova, C.; Roncero, I. G.; Di Pietro, A. and Ramos, J. 2003. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na-ATPase *ena1* in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* 2:1246-1252.
- Conn, K. L.; Tenuta, M. and Lazarovits, G. 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95:28-35.
- Eshel, D.; Miyara, I.; Ailing, T.; Dinoor, A. and Prusky, D. 2002. pH Regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol. Plant Microbe Interactions.* 15:774-779.
- Estrela, C.; Estrela, R. A. C.; Barbin, L. E.; Spanó, E. J. C., Marchesan, A. M. and Pécora, D. J. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dentist J.* 13:113-117.
- Fernández-Sandoval, M. T.; Díaz-López, D.; Gosset-Lagarda, G. y Martínez-Jiménez. 2010. Producción de etanol por *Escherichia coli* etanológica en presencia de acetato de sodio. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. VII Simposium Internacional de producción de alcoholes y levaduras. (consultado junio, 2011). Disponible en: [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/\\_IX/OIX-01.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/_IX/OIX-01.pdf).

*End of the English version*



- Fierer, N. and Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography bacterial communities. *The Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:626-631.
- Giannattasio, S.; N. Guaragnella, and E. Marra. 2012. Molecular mechanisms of programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Monographs* 22:57-75.
- Hyakumachi, M. and Luckwood, J. L. 1989. Relation of carbon loss from sclerotia of *Sclerotium rolfsii* during incubation in soil to decreased germinability and pathogenic aggressiveness. *Phytopathology* 79:1059-1063.
- Imas, P. 2000. Integrated nutrient management for sustaining crop yields in calcareous soils. National symposium on Balanced nutrition of groundnut and other field crops grown in calcareous soils of India, Gujarat, India. Disponible en: <http://www.ipipotash.org/presentn/inmfscy.html#contents>.
- Momma, N. 2008. Biological soil disinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *JARQ* 42:7-12.
- Momma, N.; Yamamoto, K.; Simandi, P. and Shishido, M. 2006. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). *J. General Plant Pathol.* 72:247-252.
- Mondal, S. N. and Hyakumachi, M. 1998. Carbon loss and germinability, viability, and virulence of chlamydospores of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* after exposure to soil at different pH levels, temperatures, and matric potentials. *Phytopathology* 88:148-155.
- Okazaki, H. and Nose, K. 1986. Acetic acid and n-butyric acid as causal agents of fungicidal activity of glucose-amended flooded soil. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:384-393.
- Olsen, M. W.; Hine, R. B. and Dutt, G. R. 1988. Control of *Phymatotrichum* root rot of wine grapes in calcareous soils with ammonium-thiosulfate applied in drip irrigation systems. *Phytopathology* 78:1521.
- Peñalva, M. A.; and Arst Jr. H. N. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:426-446.
- Plummer, D. T. 1987. An introduction to practical biochemistry. McGraw-Hill Book, UK. 332 p.
- Prusky, D.; McEvoy, L. J.; Leverentz, B. M. and Conway, S. W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol. Plant Microbe Interactions.* 14:1105-1113.
- Punja, Z. K. and Grogan, R. G. 1982. Effects of inorganic salts, carbonate-bicarbonate anions, ammonium, and the modifying influence of pH on sclerotia germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 72:635-639.
- Rousk, J.; Brookes, P. C. and Bååth, E. 2010. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biol. Biochem.* 42:926-934.
- Russel, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at the low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bact.* 73:363-370.
- Sahrawat, L. K. 2005. Fertility and organic matter in submerged rice soils. *Current Science* 88:735-739.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 1992. Relación entre el nivel de humedad y sacarosa en el suelo y la disminución de la viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 10:126-133.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 1994. Viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dugg. en suelos inundados y complementados con glucosa. *Rev. Mex. Fitopatol.* 12:125-133.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 2008 a. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Dugg.) Hennebert expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26: 32-39.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 2008 b. Germinación y viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* en respuesta al NaOCl y suelo con dextrosa. *Agric. Téc. Méx.* 34:375-385.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 2010. Ácido acético como inductor de muerte de *Phymatotrichopsis omnivora* Hennebert. XXIV Semana Internacional de Agronomía. UJED - FAZ. 4-6 de septiembre. Gómez Palacio, Durango, México. 535-539 pp.
- Samaniego- Gaxiola, J. A. 2012. Muerte de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* disminuyendo el pH en presencia de ácidos grasos volátiles. XXII Semana Internacional de Agronomía. UJED - FAZ. 10-12 de noviembre. Venecia, Durango, México. 193-195 p.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 1999. SAS System for Windows. V. 8.0. SAS Institute Inc. Cary, NC. 27513. USA.

- Tenuta, M.; Conn, K. L. and Lazarovits, G. 2002. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92:548-552.
- Uhre, G. L and Arneborg, N. 1998. Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:530-534.
- Uppalapati, S. R.; Young, C. A.; Marek, S. M. and Mysore, K. S. 2010. *Phymatotrichum* (cotton) root rot caused by *Phymatotrichopsis omnivora*: retrospects and prospects. *Mol. Plant Pathol.* 11:325-334.
- Wang, G. and Wang, I. C. D. 1984. Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *lostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:294-298.