

## Reacción de Germoplasma Mejorado de Soya [*Glycine max* (L.) Merr.] a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich y Déficit Hídrico

**Homar René Gill-Langarica**, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Biotecnología Genómica (CBG), Apdo Postal 152, Reynosa, Tamaulipas, México CP 88730; **Nicolás Maldonado-Moreno**, **Víctor Pecina-Quintero**, INIFAP, Campo Experimental Río Bravo, Apdo. Postal 172, Río Bravo, Tamaulipas, México CP 88900; y **Netzahualcóyotl Mayek-Pérez**, IPN-CBG. Correspondencia: nmayek@ipn.mx

(Recibido: Marzo 16, 2007 Aceptado: Mayo 17, 2007)

Gill-Langarica, H.R., Maldonado-Moreno, N., Pecina-Quintero, V. y Mayek-Pérez, N. 2008. Reacción de Germoplasma mejorado de soya [*Glycine max* (L.) Merr.] a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich y déficit hídrico. Revista Mexicana de Fitopatología 26:105-113.

**Resumen.** La reacción a una cepa altamente virulenta de *Macrophomina phaseolina* se evaluó en 73 líneas experimentales y diez variedades de soya (cuatro Mexicanas y seis del extranjero) en condiciones *in vitro* (semilla) y de invernadero (plántula) bajo riego-secano para identificar germoplasma resistente al hongo. Treinta semillas de cada genotipo se cultivaron por cinco días en cajas Petri con crecimiento fungoso de *M. phaseolina*. El germoplasma se estableció en invernadero en un arreglo factorial en parcelas subdivididas donde las parcelas grandes correspondieron a dos niveles de humedad (riego -con riego cada tercer día- y secano -aplicación de un riego en la siembra solamente-), las medianas a los niveles de inoculación con *M. phaseolina* (inoculado y testigo) y las chicas a los 83 genotipos de soya. Tanto *in vitro* como en invernadero, las líneas experimentales Mexicanas H86-5030 y H98-1552 y la variedad Mexicana Suaqui-86 fueron moderadamente resistentes a *M. phaseolina*, mientras que el 96.5 y 85% del germoplasma evaluado fue susceptible *in vitro* y en invernadero, respectivamente. En invernadero, la sequía incrementó la infección de *M. phaseolina* y redujo el peso seco de plántula. *M. phaseolina* redujo también el crecimiento de la soya y agravó los efectos de la sequía en la acumulación de biomasa.

Palabras clave adicionales: Pudrición carbonosa, resistencia genética.

La pudrición carbonosa del tallo es causada por el hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich y es un problema común en soya [*Glycine max* (L.) Merr.] (Wrather *et al.*, 1998). En Brasil, el hongo se considera un patógeno secundario que infecta a la soya al final de su ciclo biológico (Machado, 1987). La enfermedad se asocia principalmente

**Abstract.** The reaction of 73 experimental lines and ten soybean cultivars (four from Mexico and six from abroad) to a highly virulent isolate of *Macrophomina phaseolina* was evaluated *in vitro* (seed) and in the greenhouse (seedling), under irrigated drought-stress conditions in order to identify resistant germplasm to the fungus. Thirty seeds of each genotype were cultivated for five days in Petri dishes with cultures of *M. phaseolina*. The germplasm was established in the greenhouse using a split-split factorial arrangement, where the large plots were two humidity levels (irrigated: irrigation each third day; and drought stress: only one irrigation at sowing); intermediate plots corresponded to *M. phaseolina* levels (inoculated and control), and small plots were assigned to the 83 soybean genotypes. Mexican experimental lines H86-5030 and H98-1552, as well as Mexican cultivar Suaqui-86 were moderately resistant to *M. phaseolina in vitro* and under greenhouse conditions, while 96.5% of the soybean germplasm evaluated was susceptible *in vitro* and 85% under greenhouse conditions. In greenhouse, drought stress increased *M. phaseolina* infections and reduced seedling dry weight. The inoculation with *M. phaseolina* also reduced soybean growth and aggravated drought stress effects based on biomass accumulation.

Additional keywords: Charcoal rot, genetic resistance.

### Abbreviated article.

Charcoal rot disease is caused by the fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich and it is a common problem in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] (Wrather *et al.*, 1998). In Brazil the fungus is a secondary pathogen that infects soybean when its biological cycle ends (Machado, 1987). The disease is mainly associated to periods of water stress and then causes soybean yield losses up 50% in Paraná, Brazil (Ferreira *et al.*, 1979), while yield losses up 20% have been reported in the USA (Sinclair and Gray, 1972). In Mexico, *M. phaseolina* causes significant yield losses in soybean as well as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), sesame (*Sesamum indicum* L.)

con la ocurrencia de períodos de sequía y ocasiona pérdidas de 50% en el rendimiento de soya en Paraná, Brasil (Ferreira *et al.*, 1979), mientras que en EUA se han reportado pérdidas del 20% (Sinclair y Gray, 1972). En México, *M. phaseolina* causa daños significativos, tanto en soya como en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) y sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.], aunque se carece de estadísticas precisas al respecto (Díaz, 1992). El hongo infecta varios cultivos importantes debido a que es un patógeno no específico (Singh y Nene, 1990). El daño en soya por *M. phaseolina* se desarrolla inicialmente en la raíz, el hongo invade el tejido cortical inter e intracelularmente para finalmente infectar el sistema vascular (Ammon *et al.*, 1972). Las plántulas infectadas pueden continuar su desarrollo con síntomas no visibles hasta la fase reproductiva (Sinclair y Backman, 1989), donde sus síntomas y daño son evidentes (Bruton *et al.*, 1987; Pearson *et al.*, 1984; Sinclair y Backman, 1989). Las plantas infectadas reducen la cantidad y tamaño de las hojas para entrar en un período de senescencia (Sinclair y Backman, 1989). Las infecciones severas producen clorosis y muerte de las hojas así como la aparición de una coloración gris en vaina, peciolo, tallo y raíz debido a la formación de microesclerocios (Wyllie, 1988). En campo, los síntomas de la pudrición carbonosa aparecen bajo condiciones que reducen el vigor de la planta, como baja fertilidad del suelo (Sinclair y Backman, 1989); altas densidades de siembra (Pearson *et al.*, 1984; Sinclair y Backman, 1989); sequía y temperaturas mayores a 35°C (Odvody y Dunkle, 1979); y lesiones en la raíz debidas a maquinaria (Canaday *et al.*, 1986). El método más práctico y rentable para controlar la pudrición carbonosa en soya es la producción y cultivo de genotipos resistentes a la enfermedad (Smith y Carvil, 1997). En EUA se han identificado genotipos de soya resistentes al hongo (Canaday *et al.*, 1986; Kadlicskó, 1994; Smith y Carvil, 1997), pero pocos genotipos tienen niveles aceptables de resistencia y su eficacia en campo es inconsistente (Kendig *et al.*, 2000). Una alternativa para el manejo de la enfermedad es la rotación de cultivos resistentes al patógeno; sin embargo, al ser este hongo no específico que ataca un amplio rango de plantas hospedadoras puede sobrevivir y multiplicarse en residuos de cosecha o vivir saprofiticamente en materia orgánica en descomposición (Almeida *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 1984). Otra práctica se basa en el manejo del suelo alterando el ambiente y favorecer el desarrollo de microorganismos antagonistas al hongo (Almeida *et al.*, 2002). De acuerdo con Kendig y Rupe (1989) y Kendig *et al.* (2000), la irrigación del suelo reduce significativamente la pudrición carbonosa en soya lo que convierte al control cultural como el más efectivo para el manejo integrado del hongo. Un factor significativo que afecta la presencia del hongo en el suelo es la permanencia o incorporación de los residuos de la cosecha anterior; además, la producción continua de soya en campos con labranza cero origina la acumulación de residuos que a su vez incrementan la incidencia de la enfermedad (Almeida *et al.*, 2002). Los microesclerocios permanecen en el suelo

and sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], but no clear statistics have been registered (Díaz, 1992). The fungus infects several major crops since it is a non-specific pathogen (Singh and Nene, 1990). Damage in soybean starts in roots and later the fungus invades the vascular system (Ammon *et al.*, 1972). Infected seedlings might develop without visible symptoms until the reproductive stage (Bruton *et al.*, 1987; Pearson *et al.*, 1984; Sinclair and Backman, 1989). Infected plants have a reduced number and size of leaves; severe infection cause chlorosis and death of leaves as well as the production of grayish coloration in pods, petioles, stems, and roots due to production of microsclerotia (Wyllie, 1988). In the field, charcoal rot symptoms appear when soil fertility is low (Sinclair and Backman, 1989), when planting density is high (Pearson *et al.*, 1984; Sinclair and Backman, 1989); under water and high temperature stress (Odvody and Dunkle, 1979); and when roots are damaged by machinery (Canaday *et al.*, 1986). Production of resistant genotypes is the most practical and profitable method for control of charcoal rot in soybean (Smith and Carvil, 1997). Resistant soybean genotypes to charcoal rot have been identified in the USA (Canaday *et al.*, 1986; Kadlicskó, 1994; Smith and Carvil, 1997), but few genotypes have appropriate resistance levels and their efficiency under field conditions is inconsistent (Kendig *et al.*, 2000). Another alternative for disease management is rotation of resistant crops; however the charcoal rot pathogen is non-specific and can attack a broad range of host plants where the fungus can survive and multiply in debris or might live as saprophyte in organic matter under decomposition (Almeida *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 1984). Another practice is based on soil management improving conditions for development of antagonistic microorganisms (Almeida *et al.*, 2002). Kendig and Rupe (1989) and Kendig *et al.* (2000) found that irrigation reduces significantly charcoal rot in soybean, so this cultural practice is the most effective to manage the fungus. Harvest debris and the continuous cultivation of soybean under zero tillage system favor accumulation of residues and consequently disease incidence (Almeida *et al.*, 2002). Fungal microsclerotia may remain viable in the soil for more than four years (Watanabe, 1973), even after crop debris disintegration (Short *et al.*, 1980). They are the primary inoculum source for *M. phaseolina* in soybean (Young and Alcorn, 1984). The objectives of this work were to determine the variations of reaction of soybean germplasm to *M. phaseolina in vitro*; to determine the reaction of soybean germplasm to the fungus under greenhouse conditions and water stress, and to identify soybean genotypes with resistance to the pathogen under the conditions tested.

#### MATERIALS AND METHODS

In this work we included 83 soybean accessions: six commercial cultivars introduced from Taiwan (AGS-154) and Brazil (Curio, DM-301, Doko, EMBRAPA-48, Tukano); four Mexican cultivars (Huasteca 100, Huasteca 200, Suaqui-86, Surubi) developed by the Soybean Genetic Breeding Program

Cuadro 1. Genotipos y progenitores de germoplasma de soya (*Glycine max*) evaluado en su reacción al ataque de pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*) en el 2006.

Table 1. Genotypes and pedigrees of soybean (*Glycine max*) germplasm evaluated by their reactions to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in 2006.

Genotipo	Progenitor	Genotipo	Progenitor
AGS-154	Desconocido	H80-1773	TETABIATE x JÚPITER
CURIO	Desconocido	H80-1028	TRICHE x VICTORIA
DM-301	Desconocido	H98-1076	BR-10 x BR-25
DOKO	DOKO(4) x IAC-7-R	H98-1552	BR-11 x H88-2526
EMBRAPA-48	(DAVIS x PARANÁ) x (IAS 4 x BR-5)	H96-1256	HUASTECA-200 x STA. ROSA
TUCANO	BR83-9520-1(2) x FT ESTRELA	H85-2456	ICA-LILI-109 x F78-1430
HUASTECA-100	STA. ROSA x JÚPITER	H85-0771	ICA-LILI-109 x JÚPITER
HUASTECA-200	F81-5344 x STA. ROSA	H85-2754	ICA-LILI-109 x MINEIRA
SUAQUI-86	Desconocido	H85-2339	JÚPITER x CAJEME
SURUBI	Desconocido	H82-2641	JÚPITER x F76-6883
H96-0431	(6083-22621 x STA. ROSA) x STA. ROSA	H85-1280	JÚPITER x F78-1293
H86-4965	(F76-7233 x JUP.) x 1157-GON-M-1	H96-0357	JÚPITER x H84-2191
H86-4645	(F76-7233-1 x ICA-LILI-109) x JUP.	H82-2658	JÚPITER x ICA-LILI
H96-0065	(F81-5071 x LAMAR) x LAMAR	H82-2014	F76-6883 x T14-12-9601-2-M
H96-0889	(F81-5071 x STA. ROSA) x STA. ROSA	H84-2895	F76-7233 x ICA-LILI-109
H96-0147	(H84-1617 x STA. ROSA)	H88-0988	H82-1927F76-9835 x JÚPITER
H96-0209	(H84-1617 x STA. ROSA) x H84-1837 x LAM.	H94-0751	F92-2083(USA)
H96-0210	(H84-1617 x STA. ROSA) x STA. ROSA	H94-0764	F92-2651(USA)
H96-0786	(H84-1837 x LAMAR) x LAMAR	H88-4482	H82-2692 x H80-2639
H96-0283	(H84-1847 x STA. ROSA) x STA. ROSA	H96-0504	H84-2191 x HARDEE
H81-1706	(JUP. X HARDEE) x JUPITER	H98-1172	H88-1880 x H88-2700
H86-4717	(JUP. x ICA-LILI-109) x (F76-7233-1 x JUP.)	H82-1838	HARDEE x F76-9835
H96-0383	(PADRE x STA. ROSA) x STA. ROSA	H98-0962	H91-0235 x H88-3964
H80-1852	1154-295-154-M x (JUP. x HARDEE)	H96-1068	HUASTECA-100 x EPPS
H86-4563	1156-GON-M-60 x (F76-7233-1 x JUP.)	H98-1413	HUASTECA-100 x H88-0956
H86-5030	1156-GON-M-70 x (F76-7233-1 x 1LILI-109)	H98-0917	HUASTECA-200 x DOURADOS
H86-3687 (FM)	1157-GON-M-5 x 116-GON-M60	H98-0909	HUASTECA-200 x H88-0956
H86-3967	1157-GON-M-5 x JUPITER	H98-0740	HUASTECA-200 x H88-1880
H85-2325	3H-55-F4/149 x F78-1293	H80-0994	JÚPITER x MINEIRA
H85-3526	3H-55-F4/149 x ICA-LILI-109	H94-1597	JÚPITER x PI-17145
H85-2372	BOSSIER x F78-1293	H96-0668	JÚPITER x STA. ROSA
H98-1504	BR-27 x H88-1880	H80-2096	JÚPITER x TROPICANA
H98-1066	H88-1510 x H88-3868	H82-2052	MINEIRA x 3H-55-F4/149
H96-1331	BR-10 x H84-2191	H85-3500	MINEIRA x CES-434
H98-1641	BR-10 x H88-1880	H88-4568	PR-13(114) x STA. ROSA
H96-1096	BR-27 x H88-0956	H88-4290	PR-165-3 x H80-1784
H98-1484	BR-27 x H88-2700	H98-0777	BR-27 x H88-2755
H85-1875	STA. ROSA x JÚPITER	H98-1482	BR-27 x H91-0235
H88-1880	STA. ROSA x H80-2535	H86-2796	D78-5904 x D87-5089
H81-1808	T-10-8-073-10243-34-M x JUP.	H98-0881	BORDO DE STA. ROSA
H80-1646	T-10-8-073-10243-69-31 M x JUP.	H88-0031	F76-1377 x H80-1754
H80-1969	T-10-8-073-10243-69-31-M x (JUP. x HARDEE)		

conforme los residuos se descomponen (Short *et al.*, 1980) pudiendo permanecer viables por más de cuatro años (Watanabe, 1973). Dichos propágulos son la fuente de inóculo primario más importante de *M. phaseolina* en soya (Young y Alcorn, 1984). Los objetivos de este trabajo fueron determinar la variación en la reacción de germoplasma de soya a *M. phaseolina* en condiciones *in vitro*; determinar la reacción de dicho germoplasma en condiciones de invernadero bajo déficit hídrico; así como identificar genotipos de soya resistentes al patógeno en las condiciones de evaluación

for the humid tropic of Mexico at the Experimental Station in southern Tamaulipas, (CESTAM), of the National Institute for Forestry, Agriculture, and Livestock Research (INIFAP) located in Cuauhtemoc Station, Tamaulipas, Mexico; and 73 experimental lines belonging to the same program and variable origins. All germplasm, with the exceptions of EMBRAPA-48 (group IV); Suaqui-86 and Surubi (group V); Doko (group VII); and AGS 154 and Curio (unknown group) belong to maturity group IX which is commonly cultivated from 14 to 22°N and show indeterminate growth habit and early-

probadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se incluyeron 83 accesiones de soya: seis variedades comerciales introducidas de Taiwán (AGS-154) y Brasil (Curio, DM301, Doko, EMBRAPA-48, Tukano); cuatro variedades Mexicanas (Huasteca 100, Huasteca 200, Suaqui-86, Surubi), desarrolladas por el Programa de Mejoramiento Genético de Soya para el Trópico Húmedo de México del Campo Experimental Sur de Tamaulipas, México (CESTAM) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Estación Cuauhtemoc, Tamaulipas, México; y 73 líneas experimentales avanzadas pertenecientes al mismo programa con distintos orígenes. Salvo EMBRAPA-48 (grupo IV); Suaqui-86 y Surubi (grupo V); Doko (grupo VII); y AGS 154 y Curio (grupo desconocido), el germoplasma pertenece al grupo de maduración IX, el cual se cultiva de los 14 a 22° LN y son de hábito de crecimiento determinado y con ciclo precoz a intermedio (Cuadro 1) (Castillo-Torres y Montoya-Coronado, 1993). La cepa de *M. phaseolina* utilizada en el estudio se obtuvo de plantas de soya infectadas por el hongo y colectadas en 2004 en el CESTAM. El aislamiento se purificó transfiriendo porciones de medio de cultivo con crecimiento fungoso en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) fresco, acidificado con 1 mL de ácido láctico L<sup>-1</sup> y se incubó a 30°C durante cinco a siete días para la obtención del aislamiento puro.

### Reacción de germoplasma de soya a *M. phaseolina* in vitro.

La cepa de *M. phaseolina* se sembró en cajas Petri con PDA y se incubó en oscuridad a 30°C por siete días. Una vez que las cajas fueron invadidas completamente por el hongo, se depositaron 15 semillas de cada uno de los 83 genotipos de soya por caja Petri. Previamente, las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2% por 2 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en las cajas colonizadas por el hongo, mismas que se sellaron e incubaron a 30°C en condiciones de oscuridad durante cinco días. Cada genotipo se sembró en dos repeticiones (30 semillas). La severidad de daño causada por el hongo en la semilla se midió con la escala descrita por Manici *et al.* (1995) que consta de seis valores donde 0 = semilla sana, 1 = la semilla tiene cierto grado de decoloración, 2 = el tegumento de la semilla se encuentra invadido por micelio y microesclerocios, 3 = el tegumento se encuentra libre pero la semilla está infectada, 4 = tegumento y semilla infectados, y 5 = la semilla no germina ya que está completamente invadida por el hongo. Los valores de 0 a 2 se consideraron como reacción de resistencia y los valores mayores a 2, como reacción de susceptibilidad. El experimento se repitió dos veces.

**Reacción de germoplasma de soya a *M. phaseolina* y déficit hídrico en invernadero.** Las 83 variedades de soya se establecieron en condiciones de invernadero en charolas de poliestireno de 96 pozos bajo un arreglo factorial en parcelas subdivididas con doce repeticiones, donde la unidad

intermediate biological cycle (Table 1) (Castillo-Torres and Montoya-Coronado, 1993). The strain of *M. phaseolina* used in this work was obtained from soybean infected plants collected in 2004 at CESTAM. The isolate was purified in potato-dextrose-agar (PDA) medium acidified with 1 mL of lactic acid/L of PDA medium, and then incubated at 30°C for 5-7 days until the production of pure isolates.

### Reaction of soybean germplasm to *M. phaseolina* in vitro.

*M. phaseolina* was grown in Petri dishes with PDA and incubated in darkness at 30°C for seven days. When dishes were completely colonized by the fungus, 15 seeds from each of the 83 soybean genotypes were placed per dish. Previously, seeds were disinfested with NaOCl 2% for 2 min and rinsed in sterile distilled water. Petri dishes were sealed and incubated at 30°C in darkness for five days. Each genotype was plated twice (30 seeds per genotype). Damage severity caused by the fungus to the seed was measured using the scale described by Manici *et al.* (1995) which consists of six values, where 0 = healthy seed, 1 = slight seed discoloration, 2 = seed integuments invaded by mycelium and microsclerotia, 3 = seed integuments free, but seeds infected by the pathogen, 4 = both integuments and seeds infected, and 5 = no germinated seeds, completely invaded by the fungus. Values from 0 to 2 were considered as a resistance reaction, while values greater than 2 as susceptible. The experiment was repeated twice.

### Reaction of soybean germplasm to *M. phaseolina* and water deficits in the greenhouse.

The 83 soybean accessions were established in the greenhouse conditions in polystyrene trays with 94 holes under an experimental split-split plot design with twelve replications. The experimental unit was one seed/seedling. Large plots were two humidity conditions: irrigated and drought stress; medium plots were the inoculation levels of *M. phaseolina* (inoculated and control non-inoculated), and the small plots, the 83 soybean genotypes. At sowing, the substrate (type 'peat-moss' Premier®, Québec, Canada) was inoculated to 5% w/w ratio with rice (*Oryza sativa* L.) seed colonized by the fungus. Inoculum was prepared as described by Abawi and Pastor-Corrales (1990). Irrigated plots were maintained near field capacity by irrigating every three days after sowing, while drought plots were irrigated to field capacity only at sowing. Disease severity caused by the fungus was measured 14 days after sowing based on the scale of Abawi and Pastor-Corrales (1990) which has nine categories: 1 = no visible symptoms; 3 = up 10% of hypocotyl and root tissues with lesions; 5 = up to 25% of tissues with lesions, 7 = up to 50% of tissues with lesions, and 9 = 75% or more of tissues with lesions. Values from 1 to 3 were classified as a resistance reaction, while values greater than 3 as susceptible. The seedling dry weight (g) was recorded in each experimental unit.

**Statistical analysis.** The frequency distribution of damage caused by the fungus was calculated from the *in vitro* data, while greenhouse data were subjected to analysis of variance (ANOVA). The variables measured were subjected to Pearson's correlation analysis and the statistical analysis was

experimental consistió de una semilla/plántula. Las parcelas grandes correspondieron a dos condiciones de humedad (riego y sequía); las medianas al factor de inoculación con *M. phaseolina* (inoculado y testigo) y las chicas, a los 83 genotipos de soya. Al momento de la siembra el sustrato utilizado (tipo peat-mos Premier®, Québec, Canadá) fue inoculado en una proporción del 5% peso/peso con semilla de arroz (*Oryza sativa* L.) colonizada por el hongo. El inóculo se preparó de acuerdo con Abawi y Pastor-Corrales (1990). En las parcelas bajo riego se aplicó un riego a capacidad de campo cada tercer día durante el desarrollo del experimento, mientras que en las parcelas bajo sequía sólo se aplicó un riego a capacidad de campo al momento de la siembra. La severidad de la enfermedad causada por el hongo se determinó a los 14 días después de la siembra considerando la escala de Abawi y Pastor-Corrales (1990). Dicha escala consta de nueve clases (de 1 a 9) donde 1 = sin síntomas visibles; 3 = hasta 10% de los tejidos de hipocótilo y raíces con lesiones; 5 = hasta 25% de los tejidos con lesiones; 7 = hasta 50% de los tejidos con lesiones y 9 = 75% o más de los tejidos con lesiones. Los valores de 1 a 3 se consideraron como reacción de resistencia y los valores mayores a 3, como reacción de susceptibilidad. Finalmente, se registró el peso seco de plántula (g) de cada unidad experimental.

**Análisis estadístico.** A partir de los datos de reacción a *M. phaseolina in vitro* se determinó la distribución de frecuencias del daño causado por el hongo, mientras que los datos obtenidos en el invernadero se sometieron al análisis de varianza (ANVA). Las variables medidas se sometieron al análisis de correlación de Pearson. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SAS versión 6.12

carried out with SAS software version 6.12 (SAS Institute, 1998).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Reaction of soybean germplasm to *M. phaseolina in vitro*.

Ninety six and a half percent of soybean germplasm was susceptible to *M. phaseolina*; lines H86-5030, H98-1552 and the Mexican cv. Suaqui-86 showed the lowest damage (Fig. 1). The aggressiveness of the *M. phaseolina* isolate used in this work was high, since values lower than 1 or zeros were found. Despite that soybean germplasm was exposed to high inoculum pressure, the results agree with those observed in other crops such as maize (*Zea mays* L.), bean, soybean, peanut (*Arachis hypogea* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) or sesame *in vitro* assays (Muñoz-Cabañas *et al.*, 2005). This indicates that evaluations under laboratory conditions offer reliable and quick results, particularly closely associated with reactions under greenhouse or field conditions.

**Reaction of soybean germplasm to *M. phaseolina* and water stress in greenhouse.** ANVA for seedling dry weight detected significant differences ( $p < 0.01$ ) between inoculation levels and genotypes, and in their double and triple interactions. It also detected significant differences ( $p < 0.01$ ) between humidity and inoculation levels and their double and triple interactions (Table 2). *M. phaseolina* inoculation aggravated the negative effects of water stress due reduced dry biomass production (Table 3). Soybean genotypes showed higher values for biomass and lower damage by *M. phaseolina* under irrigated conditions in comparison to water stress, although correlation values between variables were from intermediate ( $r = -0.52^*$ ) to low ( $r = -0.35^*$ ) under water stress and irrigated conditions, respectively (Fig. 2). Cultivars Suaqui-86 and DM-301 and experimental lines H86-5030, H98-1552, H98-0695 were resistant to the fungus and showed the highest biomass mean values under both humidity conditions. H86-5030 was resistant to *M. phaseolina* under irrigated and drought conditions in greenhouse as well as *in vitro*. Results of this study confirmed that artificial inoculation and drought stress increase seedling root and stem colonization by *M. phaseolina*. Water availability in the environment is an important factor for survival and reproduction of *M. phaseolina*; Banerjee *et al.* (1982) and Viana and Souza (2002) indicated that even in water contents of -80 KPa *M. phaseolina* microsclerotia can germinate. Olaya *et al.* (1996), Olaya and Abawi (1996) and Cervantes-García *et al.* (2003) indicated that the fungus tolerates low water content maintaining its aggressiveness to common bean seed and seedlings. Kendig *et al.* (2000) reported that high soil water content negatively affect soybean root colonization by *M. phaseolina*. A negative aspect of the mexican soybean germplasm evaluated in this study, is that some genotypes belong to maturity group IX. Pearson *et al.* (1984) indicated that in general, maturity groups III, IV, and V (which are late) are resistant to the fungus. Our results agree with these findings since a low frequency of resistant genotypes to charcoal rot were observed under

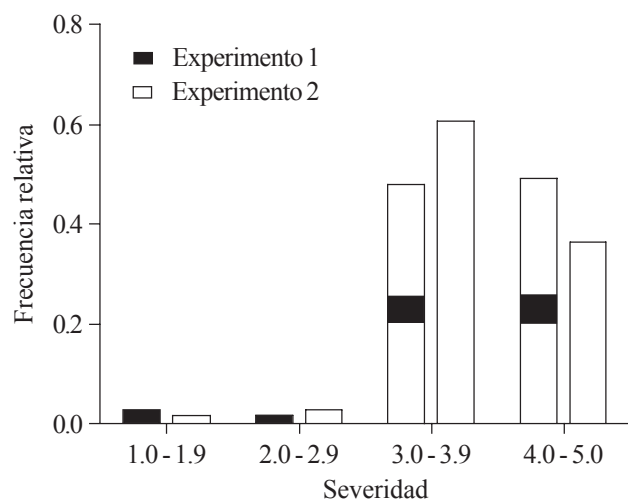


Fig. 1. Frecuencia relativa de la reacción a *Macrophomina phaseolina* de 83 genotipos de soya (*Glycine max*) en dos experimentos *in vitro*.

Fig. 1. Relative frequency of *Macrophomina phaseolina* reactions from 83 soybean (*Glycine max*) genotypes in two experiments *in vitro*.

(SAS Institute, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Reacción de germoplasma de soya a *M. phaseolina* in vitro.

El 96.5% del germoplasma de soya fue susceptible a *M. phaseolina*, donde las líneas H86-5030, H98-1552 y la variedad mexicana Suaqui-86 presentaron los menores daños (Fig. 1). La agresividad del aislamiento de *M. phaseolina* utilizado en este trabajo fue alta, pues no se observaron valores de reacción menores a 1 ó de cero. No obstante que el germoplasma de soya estuvo expuesto a una alta presión de inóculo del hongo, los resultados concuerdan con los observados en otras especies tales como maíz (*Zea mays* L.), frijol, soya, cacahuate (*Arachis hypogea* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) o ajonjolí en pruebas *in vitro* (Muñoz-Cabañas *et al.*, 2005), indicando que las evaluaciones conducidas en condiciones de laboratorio ofrecen resultados confiables y rápidos y, particularmente, asociados con los observados en condiciones de invernadero o de campo.

**Reacción de germoplasma de soya a *M. phaseolina* y déficit hídrico en invernadero.** El ANVA para el peso seco de plántula detectó diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre niveles de inoculación y entre genotipos, así como en las interacciones dobles y triples, mientras que en el caso de la severidad de la pudrición carbonosa indicó diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre niveles de humedad y de inoculación y en las interacciones dobles y triples (Cuadro 2). La inoculación con *M. phaseolina* agravó el efecto de la deficiencia hídrica pues redujo significativamente la producción de biomasa seca (Cuadro 3). Los genotipos mostraron valores mayores de biomasa y menores de daños por *M. phaseolina* en condiciones de riego comparados con la condición de sequía, aunque la correlación entre ambas variables mostró valores de intermedios ( $r = -0.52^*$ ) a bajos ( $r = -35^*$ ) en condiciones

greenhouse and *in vitro* conditions; and most genotypes evaluated belong to early maturation groups. A similar behaviour of the relationship between earliness and susceptibility to *M. phaseolina* and water stress under field conditions has been found in common bean germplasm (Mayek-Perez *et al.*, 2001; 2004). Soybean resistant genotypes identified in this work can be used to produce cultivars with resistance to charcoal rot and drought stress, or as parents in the breeding program for southern Tamaulipas. Future field work is needed to corroborate the classification of soybean germplasm reported here. Since *M. phaseolina* can not be totally eliminated from soil, this pathogen is a current and potential threat for soybean production in the tropics depending upon the occurrence and intensity of water stress periods. Therefore, manipulation of soil environment conditions for short periods of time can be useful to manage the pathogen and to reduce the damage. However, identification and use of resistant soybean genotypes to the fungus must be a consistent practice that in the medium and long terms, provide a reduction of the incidence and damage by *M. phaseolina*; as well as a more profitable crop for Mexican tropics.

## CONCLUSIONS

Soybean experimental lines H86-5030, H98-1552 and the Mexican cv. Suaqui-86 were moderately resistant to *M. phaseolina* *in vitro* and under greenhouse conditions. Resistance to *M. phaseolina* was found in Mexican soybean genotypes adapted to climatic conditions from southern Tamaulipas, and they belong to late maturity groups (V and IX), although it was neither associated with water stress tolerance nor with high dry biomass accumulation.

### End of the abbreviated article

Cuadro 2. Cuadrados medios y coeficientes de variación del análisis de varianza de la reacción de germoplasma de soya (*Glycine max*) a *Macrophomina phaseolina* en invernadero en Reynosa, Tamaulipas, México, durante el 2006.

Table 2. Mean square and coefficients of variation for the analysis of variance of reactions of soybean (*Glycine max*) germplasm to *Macrophomina phaseolina* in greenhouse in Reynosa, Tamaulipas, Mexico during 2006.

Fuente de variación	Peso seco	Severidad de daño
Repetición (11) <sup>z</sup>	0.001 ns	0.1 ns
Humedad (1)	0.001 ns	795.5**
Error A (11)	0.018	0.2
Inoculación (1)	0.208**	1.0**
Humedad x Inoculación (1)	0.001 ns	1.1**
Error B (22)	0.005	0.1
Variedades (82)	0.054**	1.2**
Humedad x Variedades (82)	0.005**	1.2**
Inoculación x Variedades (82)	0.005**	0.2**
Humedad x Inoculación x Variedades (82)	0.003**	0.2**
Error C (3608)	0.0004	0.04
Coefficiente de variación (%)	39.6	54.43

<sup>z</sup>Los números entre paréntesis indican los grados de libertad para cada fuente de variación. \*\* = significativo ( $P < 0.01$ ), ns = no significativo ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 3. Peso seco de plántula y severidad de daño por *Macrophomina phaseolina*, entre condiciones de humedad y de inoculación con el hongo en soja (*Glycine max*), en Reynosa, Tamaulipas, México.

Table 3. Seedling dry weight and *Macrophomina phaseolina* severity among humidity and inoculation conditions in soybean (*Glycine max*) in Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

Niveles	Peso seco (g)	Severidad de daño
Humedad		
Riego	0.17356	0.1000
Sequía	0.17242	2.2506
DMS (P=0.05)	0.00114	2.1506
Inoculación		
Inoculado	0.15561	1.1858
No inoculado	0.19038	1.16483
DMS (P=0.05)	0.03477	0.02097

de deficiencia hídrica y riego, respectivamente (Fig. 2). Los resultados indicaron que las variedades Suaqui-86 y DM-301 así como las líneas experimentales H86-5030, H98-1552, H98-0695 fueron resistentes al hongo, presentando además los mayores promedios de biomasa en condiciones de riego y déficit hídrico. La línea H86-5030 mostró resistencia a *M. phaseolina* tanto en riego como en sequía en invernadero y en condiciones *in vitro*. Los resultados de este trabajo confirmaron que la inoculación artificial y la sequía favorecen la colonización de raíces y tallos de la plántula de soja por *M. phaseolina*. El contenido de agua en el ambiente es un factor

importante para la supervivencia y reproducción de *M. phaseolina*, pues Banerjee *et al.* (1982) y Viana y Souza (2002) indicaron que aún con contenidos de humedad de -80 KPa ocurre la germinación de microesclerocios. Olaya *et al.* (1996), Olaya y Abawi (1996) y Cervantes-García *et al.* (2003) indicaron también que el hongo tolera bajos contenidos hídricos y aún en dichas condiciones mantiene su agresividad en semillas y plántulas de frijol. Por su parte, Kending *et al.* (2000) determinaron que el contenido alto de agua en el suelo afecta negativamente la colonización de la raíz de soja por *M. phaseolina*. Un aspecto negativo del proceso de búsqueda de resistencia a *M. phaseolina* en el germoplasma mexicano de soja evaluado en este estudio, es la presencia de genotipos pertenecientes al grupo de maduración IX, ya que Pearson *et al.* (1984) indicaron que el germoplasma tardío de los grupos de maduración III, IV y V en general es resistente al hongo. Los resultados de este trabajo coinciden en ese sentido, debido básicamente a la baja frecuencia de genotipos resistentes a pudrición carbonosa observados en condiciones *in vitro* y de invernadero, ya que pertenecen a los grupos de maduración precoz. Un comportamiento similar en cuanto a la asociación entre precocidad y susceptibilidad a *M. phaseolina* y déficit hídrico en campo, se ha observado en germoplasma de frijol (Mayek-Pérez *et al.*, 2001, 2004). Los genotipos identificados como resistentes son promisorios para derivar materiales genéticos de soja con características de resistencia combinada a déficit hídrico y *M. phaseolina*, o bien, funcionar como progenitores en esquemas de

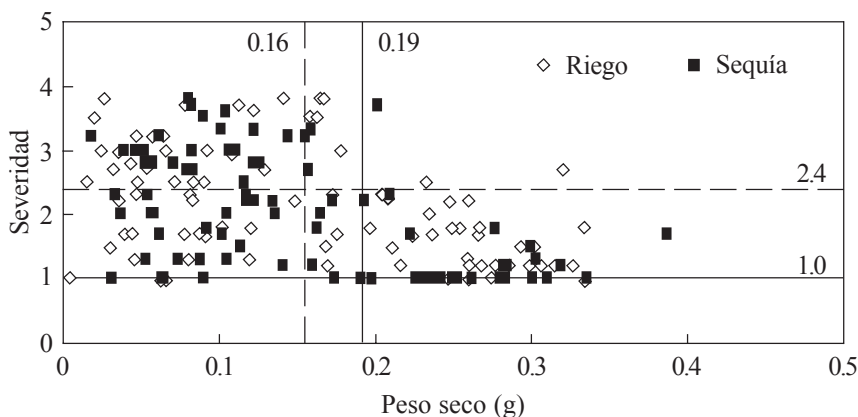


Fig. 2. Relación entre peso seco de plántula y reacción a *Macrophomina phaseolina* en soja (*Glycine max*) cultivada bajo riego y sequía en invernadero en Reynosa, Tamaulipas, México. Las líneas horizontales y verticales completas indican las medias de peso seco y severidad del hongo, respectivamente, en el germoplasma cultivado en condiciones de riego; las líneas punteadas corresponden a las medias para el nivel con déficit hídrico.

Fig. 2. Relationship between seedling dry weight and reaction to *Macrophomina phaseolina* in soybean (*Glycine max*) cultivated under irrigated and drought stress conditions in greenhouse in Reynosa, Tamaulipas, Mexico. Solid horizontal and vertical lines indicate mean dry weight and disease severity, respectively, under irrigated conditions; dashed lines indicate mean under water stress.

mejoramiento genético para el sur de Tamaulipas, México. Futuros trabajos en campo serán indispensables para corroborar la clasificación aquí realizada. El hongo *M. phaseolina* no puede eliminarse totalmente del suelo y por ello constituye una amenaza actual y potencial para la producción de soya en los trópicos, dependiendo de la ocurrencia y la intensidad de períodos de deficiencia hídrica. Por tanto, la manipulación del ambiente del suelo durante tiempos cortos se considera una medida apropiada dentro del manejo integrado del patógeno, pues ayudaría a reducir los daños por *M. phaseolina*. Sin embargo, la búsqueda y aprovechamiento de genotipos de soya resistentes al hongo debe ser práctica constante que, implementada sistemáticamente, ofrezca mejores resultados a mediano y largo plazo en la reducción de la incidencia y daños por *M. phaseolina*, y el incremento de la rentabilidad de la soya en el trópico de México.

### CONCLUSIONES

Las líneas experimentales H86-5030, H98-1552 y la variedad mexicana Suaqui-86 fueron moderadamente resistentes a *M. phaseolina* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. La resistencia a *M. phaseolina* se observó en genotipos mexicanos adaptados a las condiciones agroclimáticas del sur de Tamaulipas, y que pertenecen a los grupos de maduración tardía (V y IX), aunque no estuvo asociada con la tolerancia al déficit hídrico ni con la mayor acumulación de biomasa seca.

**Agradecimientos.** El trabajo fue financiado por el Instituto Politécnico Nacional (IPN) (CGPI-20040311) y por el programa de mejoramiento genético de soya del INIFAP del Estado de Tamaulipas, México. La publicación es financiada por el Fondo Mixto-Gobierno del Estado de Tamaulipas. H.R. Gill-Langarica agradece al IPN becas PIFI e IPN (B030906) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Registro 195236), las becas otorgadas para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias en el CBG-IPN. V. Pecina-Quintero y N. Mayek-Pérez son becarios del SNI. N. Mayek-Pérez es becario EDI y COFAA del IPN.

### LITERATURACITADA

- Abawi, G.S., and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT. Cali, Colombia. 114 p.
- Almeida, A.M.R., Amorim, L., Bergamin, F., Torres, A.E., Farias, J.R.B., Benato, L.C., Pinto, M.C., and Valentim, N. 2002. Progress of soybean charcoal rot under tillage and no-tillage systems in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 28:131-135.
- Ammon, V., Wyllie, T.D., and Brown, M.F. Jr. 1972. An ultrastructural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Physiological Plant Pathology* 4:1-4.
- Banerjee, S., Mukherjee, B., and Sen, C. 1982. Fungistasis and germination patterns of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in different soils. *Indian Journal of Microbiology* 22:190-193.
- Bruton, B.D., Jeger, M.J., and Reuveni, R. 1987. *Macrophomina phaseolina* infection and vine decline in cantaloupe in relation to planting date, soil environment, and plant maturation. *Plant Disease* 71:259-263.
- Canaday, C.H., Helsen, D.G., and Wyllie, T.D. 1986. Effects of herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 70:863-866.
- Castillo-Torres, N. y Montoya-Coronado, L. 1993. Soya. pp. 139-159. En: F. Márquez-Sánchez (ed.). *Producción y Genotecnia de Plantas Autógamas*. AGT Editor. México. 272 p.
- Cervantes-García, D., Padilla-Ramírez, J.S., Simpson, J., and Mayek-Pérez, N. 2003. Osmotic potencial effects on *in vitro* growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Phytopathology* 151:456-462.
- Díaz, F.A. 1992. Evaluación de genotipos de frijol e influencia de la temperatura con relación a la pudrición carbonosa. *Agricultura Técnica en México* 18:3-10.
- Ferreira, L.P., Lehman, P.S., and Almeida, A.M.R. 1979. Doenças da soja no Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Circular Técnica 1. Brasília, Brasil. 41 p.
- Kadlicskó, S. 1994. Resistance of seedlings of maize and sunflower hybrids as well as soybean cultivars to *Macrophomina phaseolina*. *Cereal Research Communications* 22:235-245.
- Kendig, S.R., and Rupe, J.C. 1989. Relationship of irrigation regime to populations of *Macrophomina phaseolina* microsclerotia in root tissue and yield in soybean. *Phytopathology* 79:1179-1180. (Abstract).
- Kendig, S.R., Rupe, J.C., and Scott, H.D. 2000. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Disease* 84:895-900.
- Machado, C.C. 1987. *Macrophomina phaseolina*: Biological Behavior of Isolates, Spatial Pattern of Microsclerotia in the Soil, and incidence on soybeans. Ph.D. Thesis. University of Illinois. Urbana Champaign, USA. 170 p.
- Manici, L., Caputo, F., and Cerato, C. 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climate regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease* 79:834-838.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2001. Resistencia a *Macrophomina phaseolina* en frijol común bajo condiciones de campo en México. *Agrociencia* 35:649-661.
- Mayek-Pérez, N., López-Salinas, E., Cumpián-Gutiérrez, J. y Acosta-Gallegos, J.A. 2004. Reacción de germoplasma de frijol común a *Macrophomina phaseolina* en condiciones de riego-secano en Veracruz, México. *Agronomía*



- Mesoamericana 15:45-52.
- Muñoz-Cabañas, R.M., Hernández-Delgado, S. y Mayek-Pérez, N. 2005. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:11-18.
- Odyssey, G.N. and L.D. Dunkle. 1979. Charcoal rot of sorghum: Effect of environment on host-parasite relations. *Phytopathology* 69:250-254.
- Olaya, G., and Abawi, G.S. 1996. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 80:1347-1350.
- Olaya, G., Abawi, G.S., and Barnard, J. 1996. Influence of water potential on survival of sclerotia in soil and in colonization of bean stem segments by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 80:1351-1354.
- Pearson, C.A.S., Schwenk, F.W., Crowe, F.J., and Kelley, K. 1984. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 68:1086-1088.
- Short, G.E., Wyllie, T.D., and Bristow, P.R. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70:13-17.
- SAS Institute. 1998. SAS/STAT User Guide. Release 6.03 edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 364 p.
- Sinclair, J.B., and Gray, L.E. 1972. Three fungi that can reduce soybean yields. *Illinois Research* 14:5.
- Sinclair, J.B., and Backman, P.A. (eds.). 1989. Compendium of Soybean Diseases. 3rd. ed. American Phytopathological Society. Saint Paul, MN, USA. 106 p.
- Singh, S.K., and Nene, Y.L. 1990. Cross inoculation studies on *Rhizoctonia bataticola* isolates from different crops. *Indian Phytopathology* 43:446-448.
- Smith, G.S., and Carvil, O.N. 1997. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 81:363-368.
- Viana, F.M.P., and De Souza, N.L. 2002. Efeito da interacao temperatura-tensao de agua sobre a germinacao de microesclerodios de *Macrophomina phaseolina*. *Fitopatologia Brasileira* 27:268-272.
- Watanabe, T. 1973. Survivability of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby in naturally infested soils and longevity of the sclerotia formed *in vitro*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 39:333-337.
- Wrather, J.A., Kendig, S.R., and Tyler, D.D. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* populations density and soybean yield. *Plant Disease* 82:247-250.
- Wyllie, T.D. 1988. Charcoal rot of soybeans current status. pp. 106-113. In: T.D. Wyllie, and D.H. Scott (eds.). *Soybean diseases of North Central Region*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. 149 p.
- Young D.J., and Alcorn, S.M. 1984. Latent infection of *Euphorbia lathyris* and weeds by *Macrophomina phaseolina* and propagule populations in Arizona field soil. *Plant Disease* 68:587-589.