

Efecto del estrés osmótico *in vitro* en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*

Niria Tijerina-Ramírez¹, Krystal Lira-Méndez², Victor Ricardo Moreno-Medina²
Juan Manuel González-Prieto², Netzahualcoyotl Mayek-Pérez²

¹ Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios #7, Primero de Mayo y Naranjos s/n, Col. Petrolera, Reynosa, Tamaulipas, 88680, México. ² Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. Del Maestro esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, 88710, México

Osmotic stress effect on *in vitro* growth, pathogenicity and osmolyte production in *Macrophomina phaseolina*

Abstract. The fungus *Macrophomina phaseolina* causes charcoal rot in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and although it tolerates osmotic stress the mechanisms of tolerance remain unknown. In this work under *in vitro* conditions it was determined the growth of six *M. phaseolina* isolates under variable NaCl (PDA with 0, 500 and 1000 mM); pathogenicity in four bean cultivars (Azufrado Tapatío, BAT 477, Pinto UI-114, SEQ12) growing; and the concentrations of glycerol, arabitol, D-fructose and D-glucose concentrations of each fungal isolate growing under 0, 250, and 500 mM NaCl. NaCl (500mM) reduced *M. phaseolina* growth up 50%. Isolates from Río Bravo, Tamaulipas were the most aggressive. The growth of *M. phaseolina* was negatively associated with osmolyte concentrations under no-NaCl conditions but positively with D-glucose concentration under 500 mM NaCl. Pathogenicity was negatively associated with osmolyte production. Osmotic stress induced *de novo* synthesis of osmolytes in *M. phaseolina* but reduced its aggressiveness in beans.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, HPLC analysis, arabitol, fructose, glycerol, glucose, charcoal rot.

Resumen. El hongo *Macrophomina phaseolina* causa la pudrición carbonosa en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y, aunque tolera el estrés osmótico, se desconocen los mecanismos que determinan dicha tolerancia. En este trabajo se determinó *in vitro* el crecimiento de seis aislamientos de *M. phaseolina* en condiciones de NaCl variable (PDA con 0, 500 y 1000 mM); la patogenicidad en cuatro variedades de frijol (Azufrado Tapatío, BAT 477, Pinto UI-114, SEQ12) y las concentraciones de glicerol, arabitol, D-fructosa y D-glucosa en los aislamientos cultivados con 0, 250 y 500 mM de NaCl. El NaCl (500 mM) redujo el crecimiento de *M. phaseolina* más de 50%. Los aislamientos de Río Bravo, Tamaulipas fueron los más agresivos. La concentración de arabitol se redujo hasta 90% al incrementarse el NaCl y la del resto (glicerol, D-fructosa, D-glucosa) se incrementó. El crecimiento de *M. phaseolina* se asoció negativamente con la presencia de osmolitos en ausencia de NaCl pero positivamente con la concentración de D-glucosa en 500 mM de NaCl. La patogenicidad se asoció negativamente con la producción de osmolitos. El estrés osmótico indujo la síntesis *de novo* de osmolitos en *M. phaseolina* pero redujo su agresividad en frijol.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, análisis HPLC, arabitol, fructosa, glicerol, glucosa, pudrición carbonosa.

Received 17 May 2013; accepted 2 May 2014.

Recibido 17 de mayo 2013; aceptado 2 de mayo 2014.

Autor para correspondencia: Netzahualcoyotl Mayek-Pérez
nmayek@ipn.mx

Introducción

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid., agente causal de la pudrición carbonosa, es un hongo patógeno no específico que ataca más de 500 especies de plantas (Hernández-Delgado *et al.*, 2011). En México, esta enfermedad se presenta en varios cultivos de interés económico como maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) y soya [*Glycine max* (L.) Merr.] (Mayek-Pérez *et al.*, 2001). La pudrición carbonosa tiene alta prevalencia en el norte de México donde frecuentemente se encuentran las condiciones de sequía y altas temperaturas favorables para el desarrollo y la infección del hongo (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

Los hongos muestran diversas respuestas metabólicas, patrones de crecimiento y estrategias reproductivas en respuesta a las condiciones hídricas variables. La disminución del potencial osmótico reduce el crecimiento al incrementar la tasa de respiración, y la energía se utiliza para mantener la turgencia celular (Subbarao *et al.*, 1993). El potencial hídrico (Ψ) expresa y mide el estado de energía libre del agua. El Ψ se expresa en función de sus componentes, los potenciales osmótico, de turgencia, matricial y gravitacional. El potencial osmótico (Ψ_o) representa la disminución de la capacidad de desplazamiento del agua y de la presencia de solutos, a medida que la concentración del soluto (número de partículas soluto por unidad volumen de la solución) aumenta, y tiene valores negativos. El Ψ y el Ψ_o son iguales a cero en el agua pura (Davis *et al.*, 2000).

El Ψ_o es un parámetro importante en la ecología y el crecimiento de los hongos fitopatógenos (Davis *et al.*, 2000). La reducción del potencial osmótico reduce el crecimiento y el desarrollo de hongos fitopatógenos como *M. phaseolina* debido al efecto observado *in vitro* de solutos como NaCl, KCl y sacarosa (Olaya y Abawi, 1996; Cervantes-García *et*

al., 2003). También, el estrés osmótico provoca la acumulación de osmolitos como azúcares y polioles en *F. graminearum* (Ramírez *et al.*, 2004). Concentraciones de 1000 mM de NaCl reducen significativamente la patogenicidad de *M. phaseolina* en frijol *in vitro*, así como su crecimiento (Cervantes-García *et al.*, 2003). Los objetivos de este trabajo fueron determinar el efecto del potencial osmótico variable *in vitro* en el crecimiento y la patogenicidad de *M. phaseolina* en cuatro variedades de frijol, así como identificar los osmolitos sintetizados en presencia del NaCl.

Materiales y métodos

Aislamientos

Se colectaron plantas de frijol, maíz, sorgo y soya, con síntomas de pudrición carbonosa en localidades de los estados de Sinaloa, Veracruz y Tamaulipas. Las plantas se lavaron con agua corriente durante 2 min y los tallos se seccionaron en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud. Dichos tejidos se desinfestaron con NaOCl 2 % por 2 min y se enjuagaron con agua destilada estéril; el exceso de agua se retiró con papel secante estéril. Los tejidos con síntomas de la enfermedad se sembraron en medio sintético Papa-Dextrosa-Agar (PDA; MCD Lab®; Tlalnepantla, México) acidificado con 4-6 gotas de ácido láctico por litro de medio y se incubaron por 4 d a 30 °C. Porciones del crecimiento de colonias con crecimiento típico de *M. phaseolina* se resembraron en PDA y luego, crecimiento joven de colonias se sembró en medio Agar-Agua. Los aislamientos puros se obtuvieron al volver a crecer aislamientos a partir de punta de hifa de cada uno de los seis aislamientos de *M. phaseolina* (Tabla 1).

Efecto del potencial osmótico en el crecimiento *in vitro* de *M. phaseolina*

La influencia del potencial osmótico variable en el

Tabla 1. Origen de los aislamientos de *M. phaseolina*

Clave	Hospedante	Procedencia
HMP1	Frijol	El Novillo, Aguascalientes
HMP4	Maíz	Río Bravo, Tamaulipas
HMP5	Frijol	Cotaxtla, Veracruz
HMP23	Frijol	Los Mochis, Sinaloa
HMP46	Sorgo	Río Bravo, Tamaulipas
HMP49	Soya	Altamira, Tamaulipas

crecimiento micelial de los seis aislamientos de *M. phaseolina* se evaluó en medio PDA ajustado a 0, 500 o 1000 mM de NaCl. Discos con micelio (0.6 mm de diámetro) de 4 d, de los diferentes aislamientos desarrollados en PDA, se colocaron en el centro de cajas Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA ajustado a diferentes concentraciones de NaCl (Cervantes-García *et al.*, 2003). Las cajas se colocaron en una incubadora (Fisher Scientific®, modelo 525D) por 96 h a 30 ± 1 °C en oscuridad, distribuidas en un diseño experimental completamente al azar con cuatro unidades experimentales (repeticiones). Cada unidad constó de una caja Petri equivalente a un tratamiento (combinación de un aislamiento x concentración de NaCl) en la cual se registró el diámetro de la colonia (DC, mm) cada 24 h para calcular la tasa relativa de crecimiento de la colonia (TRCC, mm d⁻¹) (Mayek-Pérez *et al.*, 1997).

Efecto del NaCl en la producción de micelio

La cantidad de micelio producido por los aislamientos de *M. phaseolina* se evaluó en medio de cultivo caldo de papa dextrosa (PDB, DIFCO®; Detroit, EUA) ajustado a 0, 500 o 1000 mM de NaCl (Cervantes-García *et al.*, 2003). De cada aislamiento, tres discos (0.6 mm de diámetro) con micelio de 4 d de desarrollo en PDA se colocaron en un tubo de plástico (50 mL capacidad) con 20 mL de PDB a diferente concentración de NaCl. Los tratamientos (aislamiento x concentración) se aleatorizaron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones; la unidad

experimental fue un tubo de plástico. El tiempo de incubación fue de 11 d a 30 °C con agitación constante a 250 rpm en incubadora MaxQ 4000® (Barnstead/Lab-Line). La biomasa fúngica se obtuvo al pasar el cultivo por papel filtro # 1 (Whatman®) acoplado a embudos de plástico estériles por 30 min; el papel y el micelio se recuperaron y secaron a 45 °C en horno de secado modelo FX5® (Shel-Lab) por 3 d para determinar su peso seco en balanza analítica modelo Voyager® (Ohaus).

Patogenicidad de *M. phaseolina* en frijol

La patogenicidad de los seis aislamientos de *M. phaseolina* se evaluó en cuatro variedades de frijol: dos clasificadas como resistentes al hongo (BAT 477, SEQ 12) y dos como susceptibles (Azufrado Tapatio, Pinto UI-114). Las semillas de cada variedad se desinfestaron en una solución al 2% de NaOCl por 2 min, se enjuagaron con dos cambios de agua desionizada estéril, se secaron con papel secante estéril y se depositaron en cajas Petri con medio PDA y micelio de *M. phaseolina* con 15 d de desarrollo. Las cajas se incubaron por 5 d a 30 ± 1 °C en incubadora Fisher Scientific® modelo 525D. Los tratamientos (combinación de un aislamiento x una variedad) se aleatorizaron con base en un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones y la unidad experimental de 20 semillas de cada variedad. La patogenicidad se evaluó en el quinto día en incubación con base en la escala descrita por Manici *et al.* (1995) y que incluye seis valores: 0 = semilla sana; 1 = decoloración de la semilla, 2 = tegumentos invadidos por micelio y microesclerocios, 3= tegumentos libres del hongo pero cotiledones infectados, 4 = tegumentos y cotiledones infectados, 5 = semilla completamente infectada, no germina y muerta.

Identificación de osmolitos sintetizados

Cada aislamiento de *M. phaseolina* se cultivó por 11 d en medio PDB con 0, 250 o 500 mM de NaCl a 30 °C en agitación

a 200 rpm. El micelio se filtró como ya se indicó antes y se lavó con agua desionizada. Luego, se pesaron 50 mg de micelio de cada aislamiento, por separado se depositaron en tubos con matriz tipo I ('perlas' de zirconio amarillas de 2 mm de diámetro y esferas de cerámica negras de 4 mm, MP Biomedicals®) para lisis de 2 mL a los que se agregó 1 mL de agua desionizada. La mezcla se sometió a lisis por 2 min en un homogenizador modelo FastPrep-24 (MP Biomedicals®) y luego se colocó en baño 'María' para hervir durante 5.5 min; las muestras se enfriaron a temperatura ambiente (25-30 °C), se añadieron 650 µL de acetonitrilo:agua (40:60) (grado cromatografía de líquidos de alta presión -HPLC-, Fermont®). Las muestras se mezclaron y centrifugaron a 13000 rpm en centrífuga refrigerada (Eppendorf® modelo 5417R) por 15 min. Finalmente el sobrenadante se filtró en papel estéril (Whatman® de 0.2 µm). Del filtrado se tomó 1 mL que se colocó en un vial de 2 mL del automuestreador de un equipo HPLC modelo 1100 de Hewlett-Packard/Agilent Technologies®. Se utilizaron para el análisis dos tipos de columnas, la Zorbax Carbohydrate de Agilent® y la Biorad® Aminex modelo HPX-87H. En ambos casos se analizaron las muestras a 190 nm de longitud de onda a una temperatura de 30 °C. Para la columna Zorbax se utilizó una fase móvil de acetonitrilo:agua 80:20 y un flujo de 1 mL min⁻¹; mientras que para la columna Aminex se utilizó una fase móvil de ácido sulfúrico 5 mM y un flujo de 0.5 mL min⁻¹. La identificación de osmolitos presentes se llevó a cabo mediante el uso del estuche comercial 'Sugar Alcohol' de Sigma® y la comparación de los tiempos de retención de los estándares y las muestras separadas. Las cantidades de cada osmolito identificado se estimaron a través del cálculo del área del pico problema multiplicado por el factor de respuesta del estándar respectivo.

Análisis de datos

Para el análisis del efecto del potencial osmótico variable se estimó, para cada tratamiento, la media y el error estándar con

el programa GraphPad Prism v 2.01 (GraphPad Software, San Diego, EUA) y la información se graficó a través del tiempo. También se calcularon medias y desviación estándar para las cuantificaciones de osmolitos por HPLC en virtud de que solo se registraron dos observaciones en la misma muestra de cada tratamiento. Los valores de TRCC se utilizaron para calcular las ecuaciones de regresión lineal simple por tratamiento. Los valores de las pendientes se sometieron al análisis de varianza y, en su caso, a la comparación de medias por el método de Tukey ($p=0.05$). Los valores de producción de micelio en medio líquido y de patogenicidad se sujetaron a la prueba de Kruskall-Wallis (Ramírez y López, 1993). Finalmente, se calcularon los coeficientes de correlación simple de Pearson entre las variables medidas. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism v. 2.01.

Resultados

El potencial osmótico en el crecimiento *in vitro* de *M. phaseolina*

El efecto del potencial osmótico en el crecimiento del micelio fue negativo, inhibiendo el crecimiento a 1000 mM de NaCl. Con 500 mM NaCl se redujo 10 % el crecimiento respecto al testigo sin NaCl (Figuras 1 y 2). No se encontró diferencia significativa entre aislamientos en cuanto a los valores de las TRCC *in vitro* dentro de cada nivel de NaCl (datos no mostrados).

Efecto del NaCl en la producción de micelio

Los aislamientos HMP 1, HMP 5, HMP 24 (provenientes de frijol) y HMP 4 (de maíz), mostraron un incremento significativo ($p<0.05$) en la masa micelial del 50% con 1000 mM NaCl; mientras que los aislamientos de sorgo y soya (HMP 46 y HMP 49) sólo tuvieron un incremento de 25 % en comparación con el testigo.

Patogenicidad de *M. phaseolina* en semillas de frijol

Las variedades Pinto UI-114 y Azufrado Tapatío mostraron los menores daños ($p<0.05$) por *M. phaseolina*, con excepción del aislamiento proveniente de soya; mientras que BAT477 y SEQ12 mostraron los mayores daños por el hongo. Los aislamientos de maíz y sorgo mostraron mayor agresividad; por el contrario, los aislados de frijol y soya fueron los menos agresivos. Adicionalmente, se determinó que los aislados menos patogénicos ($p<0.05$), HMP23 y HMP5, aislamientos de frijol, pertenecen a zonas tropicales del país; en contraparte, los aislamientos más agresivos (HMP 4 y HMP 46) fueron obtenidos de la zona semiárida del noreste de México (Figura 3).

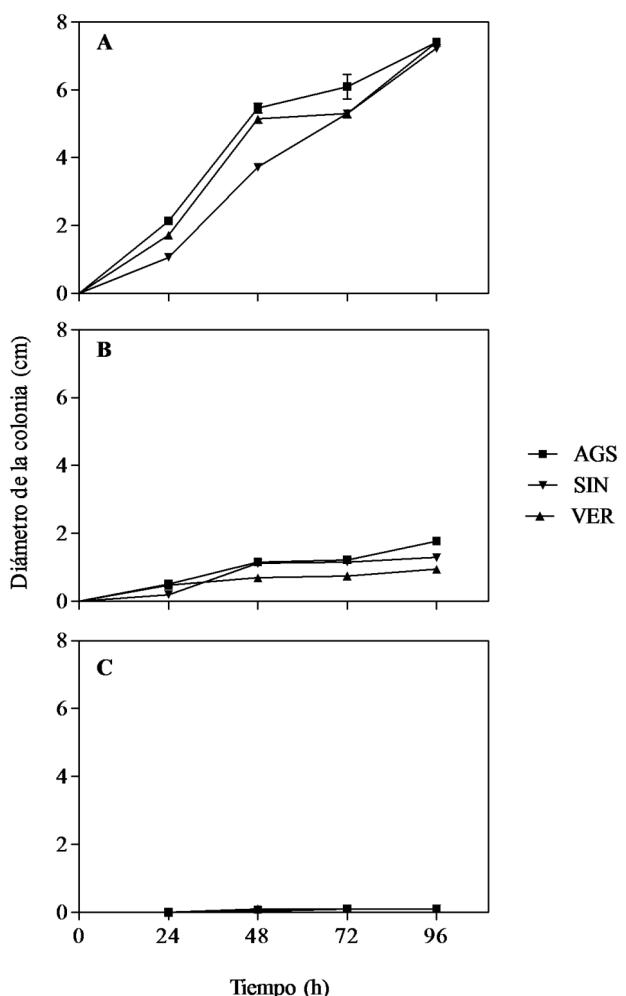


Figura 1. Diámetro medio de colonia de aislamientos de *M. phaseolina de frijol* cultivados en 0 (A), 500 (B) y 1000 (C) mM de NaCl. Las barras indican \pm error estándar.

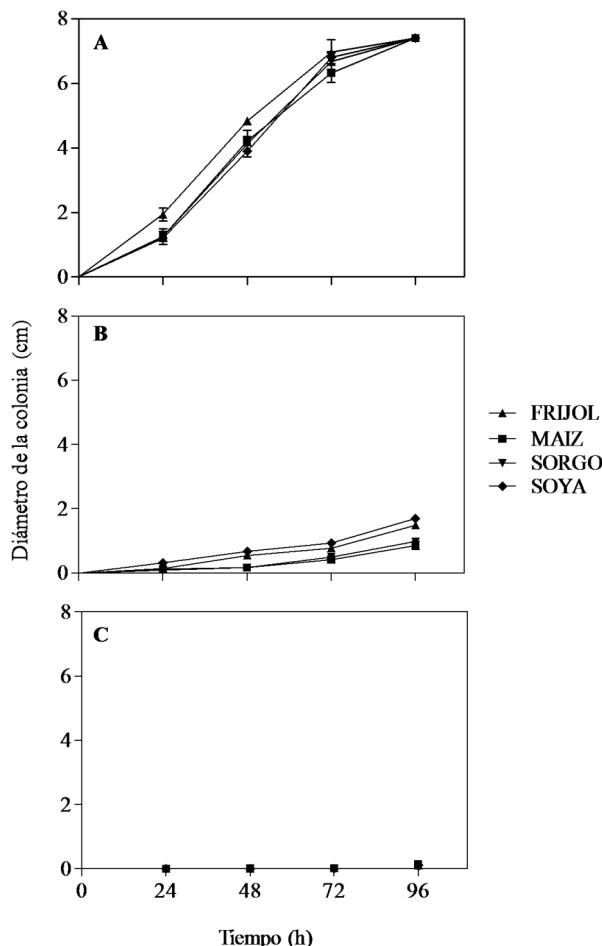


Figura 2. Diámetro medio de colonia de aislamientos de *M. phaseolina* de diferentes hospedantes a 0 (A), 500 (B) y 1000 (C) mM de NaCl, Las barras verticales indican \pm error estándar.

Identificación de osmolitos sintetizados

La producción de glicerol, D-fructosa y D-glucosa aumentó proporcionalmente con la concentración de NaCl, con excepción de HMP 46, mientras que el arabitol disminuyó al incrementarse el NaCl (Tabla 2). No se encontró relación entre la producción de osmolitos con el origen del aislamiento. El mayor crecimiento de *M. phaseolina* se asoció negativamente con la síntesis de osmolitos en ausencia de NaCl, pero positivamente con la concentración de glucosa 500 mM. Por el contrario, la patogenicidad del hongo se asoció negativamente con la producción de osmolitos (Tabla 3).

Discusión

La presencia del NaCl reduce el crecimiento *in vitro* de *M. phaseolina* (Cervantes-García *et al.*, 2003; Goudarzi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011) pues con 500 mM se redujo significativamente el crecimiento en comparación con el testigo, y con 1000 mM el crecimiento disminuyó. Lo anterior sugiere que el hongo es incapaz de mantener una presión de turgencia positiva en el micelio para contrarrestar el efecto del NaCl. La reducción del potencial hídrico se debe a un aumento en la concentración de los solutos, que limita la disponibilidad de agua libre para el crecimiento (Harris, 1981). La magnitud del efecto depende tanto de la especie de hongo como de la molécula del soluto y la temperatura de incubación, como ya se ha consignado en los casos de *M. phaseolina* (Olaya y Abawi, 1996; Cervantes-García *et al.*, 2003) y *F. graminearum*; en éste último caso, debido a la

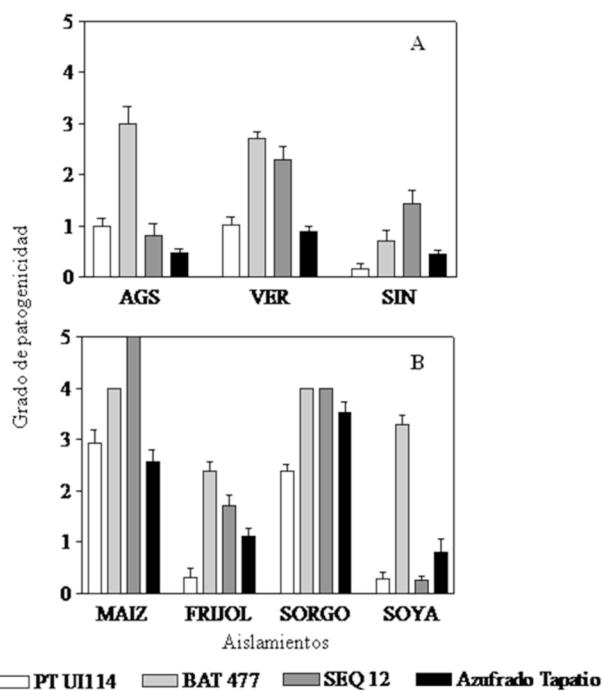


Figura 3. Patogenicidad de *M. phaseolina* aislado de frijol (A) y de cuatro hospedantes (B) en frijol común. AGS = HMP1, VER = HMP5, SIN = HMP23; Maíz = HMP 4, Frijol = HMP 5, Sorgo = HMP 46, Soya = HMP 49. Las barras verticales indican \pm error estándar.

disponibilidad limitada de agua, el hongo utiliza mayor cantidad de energía para equilibrar el potencial hídrico del citoplasma respecto al ambiente exterior, alterando la fisiología del organismo que se refleja en la disminución del metabolismo y del crecimiento (Ramírez *et al.*, 2004).

Todos los aislamientos de *M. phaseolina* aumentaron significativamente la producción de micelio en presencia de NaCl, principalmente aquellos provenientes de frijol y maíz. Esto indica que el efecto mayor del NaCl sobre el crecimiento del hongo ocurre probablemente en los ápices de las hifas, lo que ocasiona la disminución del crecimiento lineal pero incrementando la ramificación de las hifas (Mihail *et al.*, 1994; Mayek-Pérez *et al.*, 1997; Goudarzi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Esto también explica el aumento en la producción de micelio en presencia del soluto en comparación con el testigo. También, cuando *M. phaseolina* crece en medio sólido hipertónico, decrece el crecimiento radial de la colonia pero se incrementa el desarrollo de micelio aéreo (Griffith y Boddy, 1991; Cervantes-García *et al.*, 2003; Goudarzi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011) e, incluso, la producción de esporas como estrategia de sobrevivencia y de adaptación a condiciones desecantes. La síntesis de solutos en respuesta al estrés osmótico es una estrategia de osmoregulación de los hongos para modificar la concentración de solutos en la célula, mantener la turgencia celular, sostener la actividad enzimática y, por tanto, el crecimiento (Jennings y Burke, 1990).

Los aislamientos de *M. phaseolina* que mostraron mayor agresividad (HMP 4 y HMP 46) provienen de zonas áridas del norte de Tamaulipas, mientras que los aislamientos de frijol de zonas tropicales o templadas fueron menos agresivos a semillas de frijol. Esta relación entre origen y patogenicidad en frijol no concuerda con la descrita por Mayek-Pérez *et al.* (2001), quienes observaron mayor agresividad en aislamientos provenientes de zonas con clima húmedo y que se explicaba en virtud de la necesidad del hongo de 'mejorar' sus capacidades parasíticas en ambiente

Tabla 2. Osmolitos sintetizados por *M. phaseolina* en presencia de NaCl *in vitro*

Aislamiento	Glicerol ^a			Arabitol			D-Fructosa			D-Glucosa		
	0 ^b	250	500	0	250	500	0	250	500	0	250	500
HMP1	738	826	1669	167	13	7	25	110	119	6	67	210
HMP4	487	479	590	120	4	1	18	42	49	7	97	79
HMP5	305	872	813	83	6	4	3	93	40	18	77	228
HMP23	1241	746	1080	296	5	1	50	79	93	20	58	102
HMP46	1141	501	302	286	3	1	27	45	38	30	93	30
HMP49	514	736	926	142	8	2	20	77	69	4	84	100

^aValores en $\mu\text{L mg}^{-1}$.^bConcentraciones de NaCl (mM).

favorables al crecimiento y el desarrollo del hospedante (Hernández-Delgado *et al.*, 2011). Bajo condiciones de sequía el hongo afecta significativamente al hospedante en virtud de que dicho factor ambiental lo predispone a la infección y daños por pudrición carbonosa (Mayek-Pérez *et al.*, 2002; Goudarzi *et al.*, 2011).

Los hongos pueden sintetizar solutos (osmolitos activos) en respuesta al estrés osmótico para mantener la turgencia celular y mantener el metabolismo enzimático; entre estos compuestos destacan aquéllos con naturaleza polialcohólica derivados de azúcares, denominados poliolos. Compuestos como las poliaminas, compuestos nitrogenados que participan en la regulación genética, se comportan como osmolitos dadas sus altas concentraciones en el citoplasma (Roa-Cordero y Rosas-Quijano, 2013). En este trabajo se determinó que un poliol (glicerol) incrementó su concentración en el micelio de *M. phaseolina* en respuesta al estrés osmótico, como se reportó en *F. graminearum* (Ramírez *et al.*, 2004). Por el contrario, el hospedante cuenta también con una serie de genes de defensa que activan la síntesis de compuestos anti-microbianos una vez que la interacción ocurre (Rodríguez-López *et al.*, 2011; Atkinson y Urwin 2012; Sharma *et al.*, 2014). El glicerol es el osmolito compatible de mayor producción en los hongos dado que es una molécula pequeña de tres átomos de carbono que

representa una estrategia de ahorro de energía para el mantenimiento de la presión osmótica y la turgencia, pues genera aproximadamente la misma presión osmótica y la turgencia que otros polioles con mayor peso molecular como el arabitol (Davis *et al.*, 2000). En el presente trabajo, la síntesis de arabitol disminuyó drásticamente con 250 mM de NaCl. Aun en presencia de NaCl no existe relación entre el origen de los aislamientos con la producción de osmolitos.

La patogenicidad de *M. phaseolina* se asoció negativa y significativamente con la producción de osmolitos en presencia de NaCl. El hongo sintetiza una serie de compuestos que le permiten adaptarse a diversos ambientes y hospedantes y ahora que se ha publicado la secuencia genómica de *M. phaseolina* (Islam *et al.*, 2012), se amplía el horizonte de posibilidades en cuanto al estudio del hongo y su interacción con sus hospedantes desde diversos contextos: fitopatológico, genético, bioquímico y molecular.

Conclusiones

El estrés osmótico reduce el crecimiento *in vitro* de *M. phaseolina* pero incrementa la producción de osmolitos (glucosa, fructosa, glucosa). El estrés osmótico induce la síntesis *de novo* de osmolitos en *M. phaseolina*, pero reduce

Tabla 3. Coeficientes de correlación simple entre osmolitos producidos por *M. phaseolina* y patogenicidad en frijol, y crecimiento y producción de micelio

Variable	0 ^b	250	500	0	250	500
Glicerol						Arabitol
TRCC 0 ^a	-0.43*	0.41*	-0.40*	-0.40*	-0.07	-0.22
TRCC 500	-0.43*	0.41*	-0.42*	-0.42*	-0.06	-0.21
TRCC 1000	-0.43*	0.41*	-0.42*	-0.42*	-0.06	-0.24
PATP114	0.09	-0.84**	0.08	0.08	-0.42*	-0.33*
PATBAT477	0.09	-0.84**	0.09	0.09	-0.42*	-0.33*
PATAZTAP	0.22	-0.86**	0.26	0.26	-0.66**	-0.54*
PATSEQ12	0.06	-0.78**	0.07	0.07	-0.70**	-0.50*
MIC 0	0.79**	-0.70**	0.79**	0.79**	-0.47*	-0.54*
MIC 500	0.58	-0.69**	0.54**	0.54**	-0.50*	-0.53*
MIC 1000	0.53	-0.81**	0.58**	0.58**	-0.75**	-0.71**
D-Fructosa						D-Glucosa
TRCC 0	-0.49*	0.28	-0.34	0.14	-0.05	0.48*
TRCC 500	-0.49*	0.28	-0.34	0.14	-0.06	0.49*
TRCC 1000	-0.50*	0.29	-0.31	0.13	-0.06	0.51*
PATP114	-0.08	-0.75**	-0.67*	0.12	0.77**	-0.52*
PATBAT477	-0.07	-0.75**	-0.67*	0.14	0.77**	-0.52*
PATAZTAP	-0.05	-0.87**	-0.60*	0.35	0.82**	-0.67*
PATSEQ12	-0.10	-0.81**	-0.58*	0.34	0.71**	-0.48*
MIC 0	0.64*	-0.70*	0.02	0.37	0.24	-0.77**
MIC 500	0.53*	-0.64*	0.35	0.01	0.21	-0.55*
MIC 1000	0.51*	-0.76*	0.35	0.36	0.31	0.73**

^aTRCC = Tasa relativa de crecimiento de colonia a 0, 500 o 1000 mM de NaCl; PAT = Patogenicidad de *M. phaseolina* en Pinto UI-114 (P114), BAT 477, Azufrado Tapatio (AZTAP) y SEQ12; MIC = Producción de micelio a 0, 500 o 1000 mM de NaCl.

^bConcentraciones de NaCl (mM).

su agresividad en frijol. No hubo asociación entre la producción de osmolitos con el origen, pero sí entre patogenicidad y origen, pues los aislamientos más agresivos son originarios de regiones áridas de México.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyectos clave 48457-Z y 176282). N. Mayek-Pérez y J.M. González-Prieto son becarios EDI-IPN, COFAA-IPN y del S.N.I.

Literatura citada

Agradecimientos
Este trabajo fue financiado por el Instituto Politécnico Nacional (proyecto multidisciplinario 2011 clave 1350), el

Abawi, G.S., M.A. Pastor-Corrales, 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 114 p.
Atkinson, N.J., P.E. Urwin, 2012. The interaction of plant biotic and abiotic

- stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/ers100
- Bañuelos-Balandrán, J.J., N. Mayek-Pérez, 2008. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 71-75.
- Cervantes-García, D., J.S. Padilla-Ramírez, J. Simpson, N. Mayek-Pérez, 2003. Osmotic potential effects on *in vitro* growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Phytopathology* 151: 456-462.
- Davis, D.J., C. Burlak, N.P. Money, 2000. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research* 104: 800-804.
- Goudarzi, A., Z. Banihashemi, M. Maftoun, 2008. Effect of water potential on sclerotial germination and mycelial growth of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopatología Mediterranea* 47: 107-114.
- Goudarzi, A., Z. Banihashemi, M. Maftoun, 2011. Effect of salt and water stress on root infection by *Macrophomina phaseolina* and ion composition in shoot in sorghum. *Iranian Journal of Plant Pathology* 3: 69-83.
- Griffith, G.S., L. Boddy, 1991. Fungal decomposition of attached angiosperm twigs. III. Effect of water potential and temperature on fungal growth, survival, and decay of wood. *New Phytologist* 117: 259-269.
- Harris, R.F., 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: Par, J.F., W.R. Gardner, L.F. Elliot (eds.), *Water potential relations in soil microbiology*. Special Publication No. 9. Soil Science Society of America. Madison. pp. 23-25.
- Hernández-Delgado, S., K. Lira-Méndez, N. Mayek-Pérez, 2011. Genetic analysis of phytopathogen: *Macrophomina phaseolina* as a model. In: Rodríguez-Herrera, R., C.N. Aguilar, J.K. Simpson-Williamson, G. Gutiérrez-Sánchez (eds.), *Phytopathology in the omics era*. Research Signpost, Kerarla. pp. 231-250.
- Islam M.S., M.S. Haque, M.M. Islam, E.M. Emdad, A.H. Quazi, M.M. Hossen, M.Z. Hossain, B. Ahmed, S. Rahim, M.S. Rahman, M.M. Alam, S. Hou, X. Wan, J.A. Saito, M. Alam, 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13: 493.
- Jennings, D.H., R.M. Burke, 1990. Compatible solutes the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* 116: 277-283.
- Manici, L.M., F. Caputo, C. Cerato, 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., C. López-Castañeda, J.A. Acosta-Gallegos, 1997. Variación en características culturales *in vitro* de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. *Agrociencia* 31: 187-195.
- Mayek-Pérez, N., C. López-Castañeda, M. González-Chavira, R. García-Espinosa, J. Acosta-Gallegos, O. Martínez-De la Vega, J. Simpson, 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* base don pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 257-264.
- Mihail, J.D., M. Obert, S.J. Taylor, J.N. Bruhn, 1994. The fractal dimension of young colonies of *Macrophomina phaseolina* produced from microsclerotia. *Mycologia* 86: 350-356.
- Olaya, G., G.S. Abawi, 1996. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 80: 1347-1350.
- Ramírez M.E., Q. López, 1993. Métodos estadísticos no paramétricos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 223 p.
- Ramírez, M.L., S.N. Chulze, N. Magan, 2004. Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 96: 470-478.
- Roa-Cordero, M.V.R. Rosas-Quijano, 2013. La biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: 45-59.
- Rodríguez-López, E.S. J.M. González-Prieto, 2011. Expresión de genes expresados en la patogénesis de *Macrophomina phaseolina* durante la infección de *Phaseolus vulgaris*. IX Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. San Luis Potosí, México.
- Sharma, I., N. Kumari, V. Sharma, 2014. Defense gene expression in *Sorghum bicolor* against *Macrophomina phaseolina* in leaves and roots of susceptible and resistant cultivars. *Journal of Plant Interactions* 9: 315-323.
- Subbarao, K.V., T.J. Michailiades, D.P. Morgan, 1993. Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent. *Phytopathology* 83: 1454-1459.
- Zhang, J.Q., C.X. Duan, X.M. Wang, Z.D. Zhu, 2011. Study on the biologic characteristic of *Macrophomina phaseolina* causing soybean charcoal rot. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* S2: 435-451.