

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

# Agente causal del tizón foliar en *Ungnadia speciosa* Endl. (Sapindales: Sapindaceae) y la evaluación *in vitro* e *in situ* de un biocida

## Causal agent of leaf blight in *Ungnadia speciosa* Endl. (Sapindales: Sapindaceae) and the *in vitro* and *in situ* biocide evaluation

María Elizabeth Galindo-Cepeda<sup>1</sup>, Marco Antonio Granillo-Chapa<sup>2</sup>, Melchor Cepeda-Siller<sup>1</sup>, Luis Alberto Aguirre-Uribe<sup>1</sup>, Francisco D. Hernández-Castillo<sup>1</sup> y Alberto Flores-Olivas<sup>1</sup>

### RESUMEN

La planta llamada regionalmente ojo de venado, también conocida como castaño de México *Ungnadia speciosa* Endl., es utilizada en programas de forestación en México dadas sus características adaptativas y su forma de vida arbustiva. Sin embargo, su producción en invernadero se ve afectada por patógenos que causan tizones en hojas, achaparramiento y bifurcación de tallos, lo que imposibilita su uso en plantaciones. De ahí que el objetivo del presente trabajo haya sido determinar el agente causal y la evaluación *in vitro* e *in situ* del cloruro de benzalconio para su control. Se colectó tejido vegetal en campo e invernadero, se sembró en agar nutritivo y papa dextrosa agar; se realizaron las pruebas preliminares LOPAT y bioquímicas, pertinentes para la identificación. Para la incidencia y severidad, se usó el modelo propuesto por French (1982), la evaluación *in vitro* fue mediante el método de placa envenenado; usando 13 tratamientos con cinco repeticiones, evaluando las unidades formadoras de colonias (UFC). *In situ* se usaron siete tratamientos con tres repeticiones, evaluando el área foliar dañada. De acuerdo a los postulados de Koch, se encontró a *Pseudomonas syringae*, involucrada en el síntoma de tizón y malformaciones del ojo de venado. El cloruro de benzalconio, en todas las dosis controló satisfactoriamente *in vitro* en todas las dosis; y el mejor tratamiento *in situ* fue el de 3 000 ppm (7 g/L) que presentó un área foliar dañada de 17,33% y el testigo de 73,09%.

### PALABRAS CLAVE:

Cloruro de benzalconio, desierto chihuahuense, ojo de venado o castaño de México, *Pseudomonas syringae*.

### ABSTRACT

The Mexican buckeye *Ungnadia speciosa*, is one of the plants used in forestation programs in Mexico due its adaptive features and its shrub or small tree form; however production in the greenhouse is affected by pathogens that cause leaf blight, dwarf and fork stalks, making it impossible to use in plantations. The objective of this work was to determine the causal agent and evaluation of *in vitro* and *in situ* of benzalkonium chloride to control it. Plant tissue was collected in field and greenhouse and put in nutrient agar and potato dextrose agar. LOPAT and relevant biochemical test were

1 Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. megalcep@uaaan.mx.

2 Departamento Forestal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. afflooli@uaaan.mx

conducted for identification. For the incidence and severity, the model proposed by French (1982), was used. The poisoned plate flock was used for the *in vitro* evaluation with 13 treatments and five repetitions, assessing the colony forming units (CFU); seven *in situ* treatments with three replications were used evaluating damaged leaf area. It was found that for *Pseudomonas syringae*, according to the Koch's postulates involved in the symptoms of blight and deformities in the Mexican buckeye, field incidence was 12,9% and 36% in greenhouse; severity was 6,5% and 32%, respectively. Benzalkonium chloride satisfactorily controlled *in vitro* in dosages, and the best treatment *in situ* was 3 000 ppm (7 g/L), which showed a leaf damaged area of 17,33% and target treatment 73,09%.

#### KEY WORDS:

Benzalkonium chloride, Chihuahuan desert, Mexican buckeye, *Pseudomonas syringae*.

## INTRODUCCIÓN

El ojo de venado *Ungnadia speciosa* Endl., es una planta nativa del desierto chihuahuense que se utiliza como planta de ornato, como fuente de néctar para diversas especies de insectos y como planta de cobertura. Esto debido a que requiere de poca cantidad de agua para su establecimiento y supervivencia, así como su rápido desarrollo al ser plantada en suelos poco profundos y/o fértiles. Presenta una floración al inicio de la primavera, por lo que es una fuente de alimento temprana para insectos polinizadores (Burke *et al.*, 1994). Se usa además para disminuir los procesos erosivos, ya que es poco atractiva para los herbívoros (Lipe, 1999).

En México se pierden alrededor de 340 000 ha de los recursos naturales en las zonas áridas y los bosques templados (Semarnap, 2005), con sus consecuentes daños al ecosistema. En Coahuila se está trabajando con especies del semidesierto de interés ambiental. Dentro de estas

especies se encuentra *U. speciosa* con el fin de mantener la riqueza forestal del país (Banco de semillas forestales de Coahuila, s/f). Sin embargo, uno de los problemas graves para utilizar esta especie, es la falta de plantas de calidad y sanidad adecuadas para su establecimiento en plantaciones.

Dentro de los eventos más comunes en la producción de plantas en viveros y/o invernaderos, destacan las enfermedades, que llegan a ocasionar la pérdida total de lotes o afectar la sobrevivencia de las plantas, las cuales, al ser colocadas en su sitio definitivo tienen menor posibilidad de adaptarse y por lo tanto de prosperar. La producción de plantas sanas es el punto medular para lograr el éxito de las plantaciones. En áreas de distribución natural *U. speciosa* presenta malformaciones, achaparramiento y el tizón en una incidencia baja. En cambio, al producir plantas en invernaderos, donde los factores ambientales se modifican dichas plantas presentan incidencia del tizón de 32% (Cerezo, 1998). Aunado a esto, la bifurcación del tallo las hace inadecuadas para forestación.

El uso de productos químicos de amplio espectro, es una alternativa para abatir los costos de producción al disminuir la cantidad de agroquímicos usada en la producción de plantas. Uno de estos es el N-alquil dimetil bencil cloruro de amonio, que presenta un amplio espectro de acción sobre diversas especies de microorganismos.

## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son: Determinar el patógeno involucrado en el síntoma de tizón del ojo de venado en *Ungnadia speciosa*, y comprobar el efecto *in vitro* e *in situ* de un producto químico de

amplio espectro, sobre los patógenos aislados de *U. speciosa*.

## METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México y se efectuó en dos etapas durante los meses de noviembre 2005 a junio 2006. En la primera, se determinó el agente causal, así como la incidencia y severidad del tizón en campo e invernadero. En la segunda se evaluó un producto biocida *in vitro* e *in situ*.

### Determinación del agente causal

En la región noroeste de Coahuila se realizó un recorrido en el área de protección de flora y fauna de Maderas del Carmen, en el municipio de Ocampo, en el cañón denominado El Jardín (INE-Semarnap, 1997). Ahí se colectó material vegetal con la sintomatología típica del tizón, así como en el invernadero del departamento forestal de la UAAAN. Dicho material se colocó en bolsas de polietileno en una hielera para su traslado al laboratorio de fitopatología del departamento de parasitología, donde fueron procesadas siguiendo la técnica propuesta por Noval (1998). El tejido se sembró en agar nutritivo (AN) y papa dextrosa agar (PDA) ambas marcas (Difco). Se incubaron a 25 °C por 24 horas. De los microorganismos que se desarrollaron se realizó una purificación por explante y estría múltiple en agar nutritivo y se incubaron en las condiciones antes mencionadas. Las cepas bacterianas se sometieron a la tinción de Gram y la prueba de RYO, como primera técnica para separar las bacterias fitopatógenas. Posterior-

mente se sembraron en los medios semi-selectivos extracto de levadura dextrosa carbonato de calcio (YDC), Perry y Kado 1(D<sub>1</sub>M), medio B de King (KB) (King *et al.*, 1954), medio Kado y Heskett (D<sub>3</sub>K) y medio pectato cristal violeta (CVP), sugeridos por Schaad *et al.* (2001). A continuación se realizaron las pruebas rápidas de patogenicidad de acuerdo con la técnica mencionada por Rodríguez (2001), usando una concentración bacteriana de 1x10<sup>-8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC), de la escala de McFarland. Las pruebas bioquímicas levana, oxidación, pectólisis en papa, arginina (Thornely, 1960) e hipersensibilidad del tabaco (LOPAT), se realizaron de acuerdo al protocolo de cada una de ellas, además de realizar la siembra en el medio semiselectivo agar B de King con antibióticos KBBC, de acuerdo a Ovad *et al.* (1997).

### Incidencia y severidad

Se trabajó con el modelo de French (1982), en el cual la intensidad es el grado de daño ocasionado en el cultivo, que incluye dos componentes: la incidencia que es el número de plantas afectadas expresado como porcentaje del total, y la severidad que es la porción de tejido afectado, expresado como porcentaje del área total, se propuso la escala siguiente (Tabla 1) para el tizón del ojo de venado *U. speciosa*.

En el invernadero se evaluaron dos lotes de plántulas, cada uno de los cuales contenía mil plantas, en el área de Maderas del Carmen, se recorrió durante cinco días el cañón, encontrando 32 plantas de *Ungnadia*, a las que se evaluó la incidencia y severidad.

Tabla 1. Escala de evaluación de la severidad para el tizón del ojo de venado *U. speciosa* (Galindo y Granillo, 2004).

Categoría	% de daño
1	<10
2	10-25
3	26-75
4	76-85
5	>85

### Evaluación *in vitro*

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), para la variable unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC); por unidad experimental que representa una caja Petri, se evaluaron 13 tratamientos con cinco repeticiones (Tabla 2) del producto comercial Timsen (Okehi group, presentación sales). El método de la evaluación fue el plato envenenado, al que se adicionó el producto al medio de cultivo. El inóculo usado fue 0,1 mL de solución bacteriana, a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  UFC/mL de la escala de McFarland, que se dispersó en la caja Petri con la ayuda de una varilla acodada y se incubó a temperatura de 25 °C durante 24 h, en donde se llevó a cabo el conteo de UFC.

### Evaluación *in situ*

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con siete tratamientos y tres repeticiones (Tabla 3). La unidad experimental (UE) fue de nueve plantas de *U. speciosa*. Las plantas utilizadas presentaban cinco hojas y cinco folíolos, así como homogeneidad en el tamaño (0,90 m) y forma. Las variables consideradas en el experimento fueron: número de lesiones foliares considerando únicamente aquellas que mostraron el tizón característico. La

Tabla 2. Tratamientos usados *in vitro* contra *Pseudomonas syringae*.

Tratamiento	ppm de cloruro de benzalconio
1	4 000
2	3 340
3	3 000
4	2 670
5	2 000
6	1 500
7	1 000
8	500
9	250
10	180
11	70
12	120 ppm de sulfato de estreptomycin y oxitetraciclina. Testigo comercial
13	Testigo absoluto

dimensión de la lesión se expresó en porcentaje de área foliar dañada considerando a la UE como el 100% del área foliar. Para esto se usó un medidor electrónico de áreas y altura de la planta. Se llevaron a cabo seis aplicaciones cada veinte días del producto comercial Timsen, entre el 18 de diciembre de 2005 y 28 de marzo de 2006. La toma de datos se inició un día antes de la primera aplicación y terminó 20 días posteriores a la última aplicación.

Tabla 3. Tratamientos usados *in situ* para el control de *P. syringae*.

Tratamiento	ppm de cloruro de benzalconio
1	500
2	1 000
3	1 500
4	2 000
5	2 500
6	3 000
7 Testigo	0

El análisis estadístico de los resultados, se realizó con el promedio general del número de lesiones de tizón foliar, así como del área foliar dañada (%), en cada uno de los tratamientos y repeticiones, usando un diseño completamente al azar. Los datos se ingresaron al programa estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para correr el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey, a 95% y 99% de confiabilidad.

## RESULTADOS

Se aislaron de hojas, ramas y tallos los hongos *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lind. y *Penicillium expansum* Link, los que se identificaron con las claves morfológicas de Barnett y Hunter (1998), así como la bacteria *Pseudomonas syringae* van Hall la que fue identificada de acuerdo con las pruebas mencionadas por Schaad *et al.* (2001); los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Pruebas preliminares de colonias bacterianas aisladas de *U. speciosa*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	(-) bacilos cortos
Tinción de flagelos	(+) polares 2-3
Catalasa	(+)
Oxidasa	(-)
Prueba de KOH	(+)
Crecimiento en anaerobiosis	Aeróbicos estrictos

Esta bacteria únicamente se desarrolló en el medio B-King y al observar sus colonias con luz ultravioleta con filtro de 420 nm se presentó una fluorescencia verde-amarillenta, indicando la presencia del género *Pseudomonas*. En las pruebas rápidas de

patogenicidad, en las rodajas de papa no se presentó pudrición y en las hojas de tabaco se observó un tizón con un halo amarillento. Para la diferenciación de las especies se realizaron las pruebas bioquímicas que se citan en la tabla 5. Estos aislados se desarrollaron en el medio KBBC.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas y de patogenicidad para diferenciar especies del género *Pseudomonas*.

Prueba	Respuesta
Levana	(+) colonias pulvinadas
Producción del citocromo oxidasa	(-)
Manitol	(+)
Sorbitol	(+)
Celobiosa	(-)
Arabinosa	(-)
Sacarosa	(+)
Óxido-fermentación	(+) ; (-).
Crecimiento a 37 °C	(-) se incubaron a 35 °C

Los resultados de estas pruebas corresponden a la especie *syringae* de acuerdo con lo que mencionan Schaad *et al.* (2001).

## Incidencia

En condiciones de campo, de las 32 plantas que se encontraron en el Jardín de Maderas del Carmen, cuatro presentaron los síntomas de tizón foliar, achaparramiento y malformación, es decir 12,9%. En el caso del invernadero se analizaron 2 000 plantas de las que 720 presentaron estos síntomas, es decir 36% se encontraron dañadas.

## Severidad

El área foliar dañada en campo fue de 6,5% es decir, en la categoría uno de la escala de evaluación. En el invernadero

la media aritmética obtenida fue de 32%, ubicándose en la categoría tres de la escala de evaluación utilizada, como se observa en la figura 1.

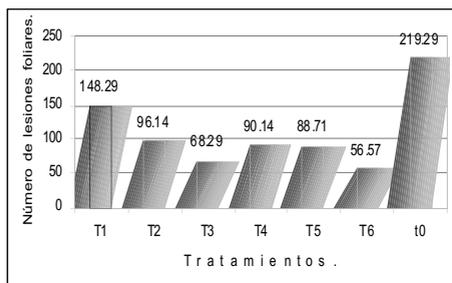


Figura 1. Número de lesiones de *Pseudomonas syringae* sobre *Ungnadia speciosa*.

### Pruebas *in vitro*

Fueron 11 las dosis de cloruro de benzalconio usadas contra *P. syringae*, desde 70 ppm hasta 4 000 ppm (0,005-1,3 g/L producto comercial), en las cuales no existió la formación de unidades formadoras de colonias bacterianas a las 24 h; así como tampoco en el tratamiento

comercial usado como testigo que fue el sulfato de estreptomycin y clorhidrato de oxitetraciclina que contenía 120 ppm (1 g/L producto comercial). En el tratamiento testigo absoluto se reportó un promedio de 1 720 UFC/mL.

### Pruebas *in situ*

El comportamiento de los tratamientos del cloruro de benzalconio en el número de las lesiones foliares de la bacteria *P. syringae*, se muestra en la tabla 6.

El análisis de varianza, indica que existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, como se observa en el promedio general del número de lesiones del área foliar, el tratamiento siete (T<sub>7</sub> testigo), presentó un promedio de lesiones de 73,09; mientras el que fue el mejor, tratamiento seis (T<sub>6</sub>, 3 000 ppm, 7 g/L de producto comercial) presenta 18,85 lesiones (Figura 2); seguido del tratamiento tres (T<sub>3</sub>, 1 500 ppm) con 22,76 lesiones por área foliar. La prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey arrojó tres categorías en los dos niveles de confiabilidad, pero en donde se usó el

Tabla 6. Número de lesiones del tizón en el área foliar de *U. speciosa* afectada por *Pseudomonas syringae*.

Tratamiento ppm	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	Tukey 95% (DHS= 22,62)	Tukey 99% (DHS= 28,47)
T1 500	46,0	52,14	50,14	49,42	26,81 B	20,95 B C
T2 1 000	19,57	36,43	40,14	32,04	9,43 A B	3,57 A B
T3 1 500	22,14	23,86	22,29	22,76	0,14 A	-5,72 A B
T4 2 000	28,57	36,14	25,43	30,04	7,43 A B	1,57 A B
T5 2 500	22,86	24,14	41,71	29,57	6,95 A B	1,09 A B
T6 3 000	21,86	15,86	18,86	18,85	-3,77 A	-9,61 A
T7 testigo	58,14	84,00	77,14	73,09	50,47 C	44,62 C

Medias con la misma letra dentro de la columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con una  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$

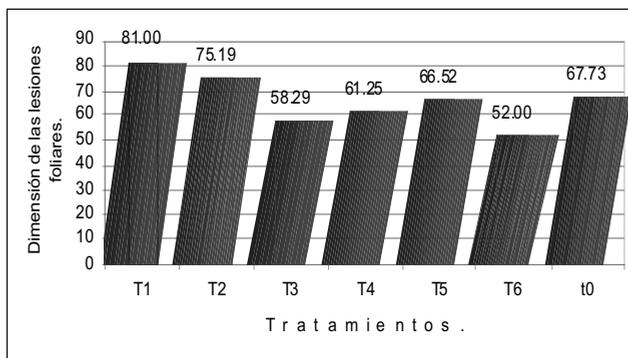


Figura 2. Porcentaje o dimensión de lesiones de *Pseudomonas syringae* usando cloruro de benzalconio.

cloruro de benzalconio todos son iguales estadísticamente, el único diferente fue el testigo ya que es el que presenta el número más grande de lesiones.

### Dimensión de las lesiones

El área foliar total dañada, muestra que hay diferencia entre los tratamientos. Sin embargo en la prueba de Tukey a 95% (DHS), se observan dos niveles de significancia, lo que estadísticamente nos dice que todos los tratamientos son

iguales. El mejor tratamiento fue el seis (3 000 ppm, 7 g/L de producto comercial) con 7,89% de área foliar dañada por *P. syringae*, mientras que el testigo (T7) 13,14% de daño; sin embargo los tratamientos uno y dos (T1, 500 ppm y T2, 1 000 ppm), presentaron mayor área foliar dañada por el tizón que ocasiona esta bacteria (Tabla 7).

La variable altura de la planta no presentó diferencia significativa en los tratamientos usados.

Tabla 7. Dimensión del área foliar dañada de *U. speciosa* por la bacteria *P. syringae*, expresada en porcentaje.

Tratamiento ppm	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	Tukey 95% (DHS= 9,44)
T1 500	32,21	27,43	21,37	27,00	17,56 B
T2 1 000	23,64	30,57	20,98	25,06	15,63 AB
T3 1 500	17,25	19,52	21,51	19,39	9,99 AB
T4 2 000	20,97	21,22	19,06	20,41	10,98 AB
T5 2 500	19,52	22,51	24,49	22,17	12,74 AB
T6 3 000	18,18	18,17	15,73	17,33	7,89 A
T7 testigo	24,33	24,81	18,59	22,57	13,14 B

Medias con la misma letra dentro de la columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con una  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum* son hongos que causan pudriciones en tejidos suculentos de frutas y hortalizas durante el almacenamiento y transporte, además de considerarse hongos contaminantes en los laboratorios de acuerdo con Smith *et al.* (2001), por lo que no presentaron una relación con los síntomas causados por el tizón foliar en *U. speciosa*. *Pseudomonas syringae* es una bacteria que causa disminución en el crecimiento, marchitamiento y defoliación del follaje así como la aparición de grietas y necrosis en el floema en plantas de olivo (Scortichini, 1997). En el ojo de venado *U. speciosa*, los síntomas del tizón foliar inician en el ápice de las hojas hacia la base, seguido de una defoliación, donde el tallo de las plantas se torna quebradizo con grietas y disminuye su crecimiento (Figura 3). Las pruebas bioquímicas y de patogenicidad que se realizaron a las cepas, nos indican que el género *Pseudomonas* únicamente

fermenta la glucosa y en condiciones aeróbicas forma un ácido que cambia el pH del medio, que se manifiesta como un cambio de color, esto de acuerdo con Hugh y Leifson (1953). Este género presenta una respuesta positiva a la presencia de la enzima citocromo-oxidasa por lo que permite separarlo de otros géneros (Lelliot *et al.*, 1966). Las colonias que crecieron en la levana fueron pulvinadas, por lo que el grupo *syringae* de *Pseudomonas* es el único que aprovecha este polisacárido y el grupo fluorescente no lo aprovecha (Schaad *et al.*, 2001). La cepa bacteriana se desarrolló en el medio semiselectivo KBBC en el cual pueden desarrollarse los patovares *syringae*, *pisi* y *tomato* de acuerdo con Ovad *et al.* (1997). Para confirmar el patovar, la capacidad para formar núcleos de hielo serviría para separar *syringae* y *pisi* de *tomato* ya que éste no los forma; y el patovar *syringae* de la *pisi* con la prueba DL homoserina, debido a que la respuesta del primero es negativa y la del segundo positiva.



Figura 3. Daño de *Pseudomonas syringae* sobre hojas y plantas de *U. speciosa*.

Las plantas de *U. speciosa* en el invernadero presentaron 36% de incidencia de tizón y malformaciones por lo que no pueden ser usadas en reforestación, ya que los técnicos de Comisión Nacional Forestal (INE-Conafor) al evaluar la calidad fitosanitaria de las plantas únicamente aceptan lotes con 20% de daño (González, 2004).

Las diferentes dosis *in vitro* de cloruro de benzalconio no permitieron el crecimiento bacteriano. Esto coincide con lo que reportan investigaciones de Ohio State University (1997), en donde usaron 620 ppm de cloruro de benzalconio en placas de papa dextrosa agar, y no existió la formación de UFC de las bacterias *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Xanthomonas campestris*. Esta misma dosis se usó *in vitro* y campo para controlar al hongo *Alternaria* spp., que afecta a la planta *Tagetes erecta* L., en donde se logró 85% de inhibición del crecimiento del hongo *in vitro* y de 73% en campo (Robert, 2000). Este producto no muestra una buena acción para eliminar bacterias esporógenas como *Bacillus subtilis* cuando se usa una concentración de 0,5 mg/mL (Acosta *et al.*, 2001), la bacteria *Pseudomonas syringae* no forma este tipo de estructura de resistencia sino que sobrevive a condiciones adversas en restos de tejido vegetal y cánceres de la planta, por lo que debe destruirse y aplicarse el producto de manera preventiva. El cloruro de benzalconio al usarse *in situ* a dosis de 3 000 ppm (7 g/L) en plantas de *U. speciosa*, éstas presentaron 7,89% del área foliar dañada por la bacteria, el testigo 13,14%. Esto coincide con lo que mencionan Rodríguez y Jiménez (1999), al evaluar el Timsen contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango encontraron que el área del fruto fue de 6,98% al usar una dosis de 400 ppm una sola vez, contra el testigo que presentó 14% de área dañada; lo mismo encontraron Páez y Peña (2000)

en mango contra este mismo hongo, a dosis de 620 ppm el área que presentó daño fue de 7,0% y en el testigo de 21%.

La bacteria *P. syringae* es la causante del síntoma tizón foliar que presenta el huésped comúnmente llamado ojo de venado *U. speciosa*, en campo presenta un 12,9% de incidencia y en invernadero de 36%; la bacteria es controlada por las 11 dosis de cloruro de benzalconio (0,005-1,3 g/L) *in vitro* ya que no presentó la formación de UFC. El mejor tratamiento *in situ* para controlar el tizón en el ojo de venado en invernadero fue de 3 000 ppm (7 g/L), en donde presentó un daño foliar de 17,33%.

## REFERENCIAS

- Acosta, E., A. Herrera y V.H. Mata. 2001. El cloruro de benzalconio. Salud Pública de México 43(6):499-573.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4a. ed. APS Press. 218 p.
- Burke, H.R., J.A. Jackman y M. Ose. 1994. Insects associated with woody ornamental plant in Texas. Texas A&M University. Department of Entomology. <http://entowww.tamu.edu/extension/publications/woody.html>
- Cerezo, H.V. 1998. Identificación de microorganismos presentes en *Azalea* spp., *Gardenia jasminoides*, *Ungnadia speciosa* así como el control químico de bacterias *in vitro*. Tesis de licenciatura. UAAAN, Saltillo, Coahuila, México. 53 p.
- Coahuila, Banco de Semillas Forestales (s/f). <http://www.coahuilatrasmite.gob.mx/boletines/documentos-boletines/publicaciones%>

- French, R.E. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica. 132 p.
- González, C.A. 2004. Comunicación personal. Técnico Conafor Región VI Río Bravo. Saltillo, Coahuila, México.
- Hugh, R. y E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolites of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *L. Bacterial* 66:24-26.
- Instituto Nacional de Ecología-Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (INE-Semarnap). 1997. Programa de manejo del área de protección de flora y fauna Maderas del Carmen. 1a. ed. México. 512 p.
- King, E.O., M.K. Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- Lelliot, R.A, E. Billing y A.C. Hayward. 1966. A determinative scheme for fluorescence plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bact.* 29:470-478.
- Lelliot, R.A. y D.E. Stead. 1987. Methods for diagnosis of bacterial disease of plants. *Methods in plant pathology*. Ed. T. F. U., Preece Vol. 2, Blackwell Scientific Publications Oxford, pp. 100-200.
- Lipe, J.A. 1999. Deer resistant landscape plants. The Texas A&M University System. <http://www.tpoint.net/neighbor/Deer.html>.
- Noval, A.C. 1998. Bacterias. Dirección General de la Sanidad de la Producción Agrícola. Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Madrid, España, pp. 118-148.
- Ohio State University. 1997. Timsen research summary report. 5 p.
- Ovad, V., K. Rudolph y K. Krohn. 1997. Serological classification of *Pseudomonas syringae* pathovares based on monoclonal antibodies towers the lipopolisaccaride O-chains, pp. 526-531. *In*, Rudolph, K., T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian y J. von Kietzell, eds. *Developments in plant pathology*, vol. 9: *Pseudomonas Syringae* pathovares and related pathogens. Kluwer Academia Publishers. Boston. 546 p.
- Páez, R.A. y R. Peña. 2000. Manejo de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) en la fase de poscosecha en mango c.v Vallenato. *Patología de Frutas Tropicales y Poscosecha*, Abstracts of the 46th annual meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Miami Fl. EUA, pp. 112-115.
- Rodríguez M., M.L. 2001. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. UACH. Chapingo, Edo. de México. 119 p.
- Rodríguez, N.S. y C. Jiménez. 1999. Efecto de benzoato de sodio y timsen en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango. Resúmenes de los trabajos presentados en XVI Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, Venezuela. 72 p.
- Robert, R. 2000. Identification and control of foliar spot pathogen in *Tagetes erecta* L. National Agricultural University, La Molina Phytopatology Speciality. Lima, Perú. 36 p.
- Schaad, N.W., J.B. Jonas y W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 5a. ed. APS Press. Minnesota, EUA, 373 p.

- Scortichini, M. 1997. *Pseudomonas syringae* pv *syringae* associated with decline in olive due to excess of magnesium. *Informatore Fitopatologico* 47(12):47-50.
- Semarnap. 2005. Programa forestal y de suelo 1995-2000. Comisión Nacional Forestal. Gerencia de Geomática. México, D.F.
- Smith, I.M., J. Dunez, D.H. Phillips, R.A. Lelliot y S.A. Arched. 2001. Manual de enfermedades de plantas. Ed. Mundi Prensas. 671 p.
- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23:27-52.

Manuscrito recibido el 29 de noviembre de 2007

Aceptado el 6 de marzo de 2009

Este documento se debe citar como: Galindo-Cepeda, M.E., M.A. Granillo-Chapa, M. Cepeda-Siller, L.A. Aquirre-Urbe, F.D. Hernández-Castillo y A. Flores-Olivas. 2010. Agente Causal del tizón foliar en *Ungnadia speciosa* Endl. (Sapindales: Sapindaceae) y la evaluación *in vitro* e *in situ* de un biocida. *Madera y Bosques* 16(1):5-15.