

Reductive disinfestation, soil desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery

Desinfestación reductiva, suelo desecado y *Trichoderma harzianum* para controlar *Phymatotrichopsis omnivora* en vivero de nogal pecanero

José Alfredo Samaniego-Gaxiola*, Campo Experimental La Laguna INIFAP, Bulevar José Santos Valdez 1200 Pte., Colonia Centro Matamoros, Coahuila, México. C.P. 27440; Aurelio Pedroza-Sandoval, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez Km 40, Bermejillo, Durango. C.P. 35230; Yasmín Chew-Madinaveitia, Arturo Gaytán-Mascorro, Campo Experimental La Laguna INIFAP, Bulevar José Santos Valdez 1200 Poniente, Colonia Centro Matamoros, Coahuila, México. C. P. 27440. *Autor de correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

Recibido: 28 de Agosto, 2018.

Aceptado: 28 de Marzo, 2019.

Samaniego-Gaxiola JA, Pedroza-Sandoval A, Chew-Madinaveitia Y and Gaytán-Mascorro A. 2019. Reductive disinfestation, soil desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery. Mexican Journal of Phytopathology 37(2).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1808-7

Primera publicación DOI: 08 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 08, 2019.

Resumen. En el laboratorio, suelo adicionado con glucosa 0.5-4.0 mg g⁻¹ e inundado, el pH y el potencial oxidación-reducción (ORP) alcanzaron valores de 6.2 y -250 mV, también observamos hasta 22 mmol L⁻¹ de ácidos grasos volátiles (VAFs). El sobrenadante del suelo se ajustó o no a pH ~ 4, luego los esclerocios de *P. omnivora*

Abstract. In the laboratory, flooded soil with glucose, 0.5-4.0 mg g⁻¹, the pH and potential oxidation-reduction (ORP) reached values of 6.2 and -250 mV, also, we observed up to 22 mmol L⁻¹ of volatile fatty acids (VAFs). The supernatant of the soil was adjusted or not to pH ~ 4, then sclerotia of *P. omnivora* were submerged in it. The sclerotia died only in supernatants at pH ~ 4 that came from soil with 2.0 and 4.0 mg g⁻¹ of glucose added. In the field, there were six treatments: a control or untreated soil (C); 55 t ha⁻¹ of molasses was added and the ground was covered with plastic (M); inoculated soil with *Trichoderma harzianum* (T); dried soil (DS) and their combinations DS+M, DS+T and DS+M+ T. Where molasses was added, the pH and ORP reached 6.5 and -200 mV. The pH and ORP reached in soils with glucose and molasses are characteristic of soil reductive disinfestation (RSD). In the field, treatments were applied to the

se sumergieron en él. Los esclerocios murieron solo en sobrenadantes a pH ~4 que provenían del suelo con 2.0 y 4.0 mg g⁻¹ de glucosa añadida. En el campo, hubo seis tratamientos: un testigo o suelo no tratado (C); se agregaron 55 t ha⁻¹ de melaza y el suelo se cubrió con plástico (M); suelo inoculado con *Trichoderma harzianum* (T); suelo desecado (DS) y sus combinaciones DS+M, DS+T y DS+M+T. Cuando se añadió melaza, el pH y el ORP alcanzaron 6.5 y -200 mV. El pH y el ORP alcanzados en suelos con glucosa y melaza son característicos de la desinfestación reductiva del suelo (RSD). En el campo, los tratamientos se aplicaron al suelo, con cuatro (repeticiones) parcelas por tratamiento y se sembraron 12 nueces por parcela. Después de tres años, no hubo diferencia en la incidencia y la mortandad de los árboles causada por *P. omnivora*, pero las raíces fueron invadidas por *Trichoderma* sp.

Palabras clave: desinfestación reductiva del suelo, antagonismo, control biológico.

En México, el nogal pecanero *Carya illinoensis* (Wangenh.) Koch es un cultivo establecido en 112,000 ha, cuyo valor fue de 330 millones de dólares en 2015 (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2018). La enfermedad más importante de las raíces del nogal es la pudrición de la raíz causada por el hongo *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert (Herrera-Pérez y Samaniego-Gaxiola, 2002). Un método reciente para el control de patógenos de plantas en el suelo, es la desinfestación reductiva del suelo (RSD), donde se agrega una fuente de carbono (C) como melaza, paja de trigo o compuestos ricos en carbohidratos al suelo, luego se satura con agua y se cubre con un plástico (Momma *et al.*, 2006).

soil, with four plots per treatment and 12 pecan tree seeds were planted per plot. After three years, there was no difference in incidence and mortality of trees caused by *P. omnivora*, but the roots were invaded by *Trichoderma* sp.

Key words: soil reductive disinfestation, antagonism, biocontrol.

In Mexico, the pecan tree *Carya illinoensis* (Wangenh.) Koch is a crop established in 112,000 ha, whose value in generating foreign currency was of 330 million dollars in 2015 (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2018). The most important disease of the pecan tree roots is the cotton root rot caused by the fungus *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert (Herrera-Pérez and Samaniego-Gaxiola, 2002). A recent method for the control of soil borne plant pathogens is the reductive soil disinfestation (RSD), where a source of carbon (C) such as molasses, wheat straw or compounds rich in carbohydrates are added to the soil, then it is saturated with water and covered with a plastic (Momma *et al.*, 2006). In the RSD, the added residues are decomposed in an anaerobic condition, the pH of the soil solution becomes acidic, the oxidation-reduction potential or ORP (*Eh*) reaches negative (reductive) values and volatile fatty acids (VFAs), organic sulfur compounds and metal ions Mn²⁺ and Fe²⁺ are generated all toxic to fungi, bacteria and weeds (Hewavitharana *et al.*, 2014; Momma, 2008; Momma *et al.*, 2011). The VFAs are toxic to fungi, bacteria and nematodes (Shrestha *et al.*, 2016) and the toxicity increases in acidified media (Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval, 2013). The survival of sclerotia of *P. omnivora* was null after being immersed in VFAs solutions, as well as in flooded soil with glucose added

En la RSD, los residuos agregados se descomponen en una condición anaeróbica, el pH de la solución del suelo se acidifica, el potencial oxidación-reducción ORP (*Eh*) alcanza valores negativos (reductores) y ácidos grasos volátiles (VFA), compuestos orgánicos de azufre y iones metálicos Mn^{2+} y Fe^{2+} se generan, tóxicos para hongos, bacterias, nematodos y malezas (Hewavitharana *et al.*, 2014; Momma, 2008; Momma *et al.*, 2011; Shrestha *et al.*, 2016). Los VFAs aumentan su toxicidad acidificando el medio (Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval, 2013).

La supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* fue nula después de sumergirse en soluciones de FAVs, así como en suelo inundado con glucosa agregada (Samaniego-Gaxiola, 1994; Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013). Sin embargo, no se ha registrado si el suelo infestado con *P. omnivora*, inundado y agregado con glucosa induce los cambios de la RSD, si los FAVs en la solución de este suelo solo o ajustando su pH pueden matar los esclerocios del hongo. Por otro lado, los esclerocios de *P. omnivora* son susceptibles de morir cuando se secan o permanecen en contacto con *Trichoderma* spp. (Samaniego-Gaxiola 2008; Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010). El suelo seco o inoculado con *Trichoderma harzianum* Rifai, podría disminuir el inóculo de *P. omnivora*. Los métodos de control en el suelo: RSD, desecado e inoculando con *T. harzianum*, podrían combinarse y dar mejores resultados que individualmente, para proteger a al nogal pecanero contra la pudrición texana. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: i) registrar el pH, ORP, producción de FAVs en el suelo agregado con glucosa e inundado permanentemente; ii) evaluar la supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* después de permanecer en el sobrenadante proveniente de este suelo, donde el pH se ajusta o no ~ 4 ; iii) evaluar la incidencia y muerte nogal pecanero sembrado en suelos tratados

(Samaniego-Gaxiola, 1994; Samaniego-Gaxiola and Balagurusamy, 2013). However, it has not been registered if soil infested with *P. omnivora*, flooded and added with glucose induce the changes of the RSD, if the VAFs in the solution of this soil alone or adjusting its pH can kill the sclerotia of the fungus. On the other hand, the sclerotia of *P. omnivora* are susceptible to die when they are dried or remain in contact with *Trichoderma* spp. (Samaniego-Gaxiola 2008; Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2010). Dried or inoculated soil with *Trichoderma harzianum* Rifai, could decrease the inoculum of *P. omnivora*. The RSD control methods, dried the soil and inoculating *T. harzianum* in soil, could be combined and give better results than individually, to protect the pecan tree from cotton root rot. Therefore, the objectives of this work were: i) to register the pH, ORP, production of VAFs in soil added with glucose and flooded permanently; ii) to evaluate the survival of sclerotia of *P. omnivora* after remaining in the supernatant coming from this soil, where the pH is adjusted or not to ~ 4 ; iii) to evaluate the incidence and death of the pecan tree sown in soils treated with RSD using molasses (M), inoculated with *T. harzianum* (T), dried soil (DS) and its combinations DS+T, DS+M and DS+T+M, and iv) record changes in pH and ORP in treated field soils.

Soil was extracted at a depth of 0-5 cm from the Hormiguero orchard located on the Torreón-San Pedro Km 16 road (25° 41' 16.3" N 103° 19' 52.4" W). To eight repetitions (glass flasks) of 1L were added 400 g of soil, then 80 ml of a glucose solution of 0.0, 0.5, 2.0 and 4.0 mg g⁻¹, then 250 ml of water (flooded) and finally the flasks were incubated for five days at 28 °C. From the beginning of the incubation period, 20 ml of the supernatant of each flask were extracted daily. This sample was divided into two groups of vials (each with 10 ml), in both groups pH and ORP were measured, with a multi-

con RSD utilizando melaza (M), inoculado con *T. harzianum* (T), suelo desecado (DS) y sus combinaciones DS+T, DS+M y DS+T+M; y iv) registrar los cambios del pH y ORP en suelos tratados.

El suelo se extrajo de 0-5 cm de profundidad, del huerto Hormiguero ubicado en la carretera Torreón-San Pedro Km 16 (25° 41' 16.3" N 103° 19' 52.4" W). Ocho repeticiones (frascos de vidrio) de 1 l se agregaron 400 g de suelo, luego 80 ml de una solución de glucosa de 0.0, 0.5, 2.0 y 4.0 mg g⁻¹, luego 250 ml de agua (inundación) y finalmente se incubaron los frascos, por cinco días a 28 °C. Desde el comienzo del período de incubación, se extrajeron diariamente 20 ml del sobrenadante de cada frasco. Esta muestra se dividió en dos grupos de viales (cada uno con 10 ml), en ambos grupos se midieron el pH y la ORP, con un multi-parámetro de marca HI 9828 de Hanna Instruments. A un grupo de viales no se ajustó el pH y el otro sí a pH ~ 4 al añadirle H₂SO₄; en este último caso, se cuantificó la cantidad de ácido utilizado para ajustar el pH. En ambos grupos de viales, se colocaron 25 esclerocios de *P. omnivora* (por vial) durante una hora, y luego se midió el pH y los esclerocios se extrajeron y germinaron. Los esclerocios fueron reproducidos, cosechados, manejados y germinados según lo indicado por Samaniego-Gaxiola (2008).

Desde el segundo hasta el quinto día de incubación de los frascos, se tomaron muestras compuestas del sobrenadante, para cada dosis de glucosa-suelo 0.0, 0.5, 2.0 y 4.0 mg g⁻¹. Cada muestra compuesta de 10 ml se analizó para ácidos orgánicos, mediante cromatografía líquida de alta presión, en una columna Aminex HPX 87H, 300 x 7.8 mm, con fase móvil: H₂SO₄ 5 mM, condiciones de flujo de 0.5 ml / min, 50 °C y análisis de detección por disposición de diodos a 210 nm. La cuantificación de la curva estándar se obtuvo por estándares de referencia. El perfil de cada ácido se verificó mediante el espectro de absorción y el tiempo de retención correspondiente.

parameter HI 9828 brand Hanna Instruments. A group of vials did not have an adjusted pH and the other were added H₂SO₄ to adjust the pH ~ 4; in the latter case, the amount of acid used to adjust the pH was quantified. In both groups of vials, 25 sclerotia of *P. omnivora* (per vial) were placed for one hour, and then the pH in the vials was measured. Sclerotia were extracted and germinated in sand. The sclerotia of *P. omnivora* were reproduced, harvested, managed and germinated as indicated by Samaniego-Gaxiola (2008).

From the second to the fifth day of incubation of the flasks, composite samples of the supernatant were taken, for each dose of glucose-soil 0.0, 0.5, 2.0 and 4.0 mg g⁻¹. Each composite sample of 10 ml was analyzed for organic acids by high pressure liquid chromatography, on an Aminex HPX 87H column, 300 x 7.8 mm, with mobile phase: 5 mM H₂SO₄, flow conditions of 0.5 mL / min, 50 °C and an analysis of detection by arrangement of diodes at 210 nm. The quantification of the standard curve was obtained by reference standards. The profile of each acid was checked by absorption spectrum and corresponding retention time.

In the Hormiguero orchard, in March of 2012, one control and six randomized treatments were established, each treatment had four repetitions. The repetition was a micro-plot of 3x2 m, where 12 pecan-nut seeds were planted equidistantly. Between plots, towards both ends, a space of four meters of unseeded soil was left. The control treatment (C) consisted in the dry sowing of the walnut and then the application of a 15 cm irrigation sheet, similar irrigation sheet was applied for the rest of the treatments. The desiccated soil (DS) was a treatment where soil was extracted up to 60 cm and dried in the sun to reach a humidity of less than 5%, then the soil was returned to the well and the nuts were sown. The moisture that the soil reached in all treatments (soils with or without desiccation) was determined by taking two samples of 100 g

En Hormiguero, en marzo de 2012, se establecieron un control y seis tratamientos aleatorios, cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. La repetición fue una microparcela de 3x2 m, donde se sembraron equidistantemente 12 semillas de nuez pecanera. Entre parcelas, hacia ambos extremos, de dejaron cuatro metros de tierra sin sembrar. El tratamiento control (C) consistió en la siembra en seco de la nuez y luego la aplicación de una lámina de irrigación de 15 cm, que fue similar para los tratamientos. En el tratamiento suelo desecado (DS) el suelo se extrajo hasta 60 cm y secó al sol para alcanzar una humedad inferior al 5%, luego se devolvió el suelo al pozo y se sembraron las nueces. La humedad de todos los tratamientos (suelos con o sin desecación) se determinó tomando dos muestras de 100 g para cada profundidad y repetición; Todas las muestras se pesaron antes y después de secar durante 48 horas con aire seco a 100 °C para determinar su contenido de humedad (W/W). La RSD se implementó utilizando melazas P/P (M) a una tasa de 33 kg (55 t ha⁻¹), las melazas se disolvieron en 800 l de agua de riego y se vertieron en la parcela, y luego la superficie se cubrió durante 14 d con plástico negro Polietileno de 600 µm. El tercer día después de aplicar las melazas, se vertieron 100 l de una solución de H₂SO₄ (23 mmol L⁻¹) en el suelo (retirando el plástico). La parcela se cubrió nuevamente con plástico durante 11 d, luego se destapó por dos semanas para permitir la aireación, y después se sembraron las nueces. Un aislado de *T. harzianum* (T) obtenido de la rizósfera de nogal pecanero se utilizó para hacer un inóculo agua, arena y paja de trigo, según lo descrito por Lewis y Papavizas (1984), se aplicó 3 kg de inóculo (peso seco) por parcela. Otros tres tratamientos combinados fueron DS + M, DS+T y DS+M+T, según el caso, primero se secó el suelo, luego se agregaron las melazas y finalmente se aplicó *T. harzianum*.

En cada parcela, el tercer día después de aplicar las melazas, ocho tubos de PVC se enterraron

for each depth and repetition; all the samples were weighed before and after drying 48 hours with dry air at 100 °C to determine their moisture content (W/W). The RSD was implemented using molasses (M) at a rate of 33 kg (55 t ha⁻¹), molasses were dissolved in 800 L of irrigation water and poured into the plot, and then the surface of the plot was covered with black plastic polyethylene of 600 µm during 14 d. On the third day after applying the molasses, 100 L of a solution of H₂SO₄ (23 mmol L⁻¹) was poured to the ground (removing the plastic). The plot was again covered with the plastic during 11 days, then it was uncovered by two weeks to allow aeration, and later the nuts were sown. An isolate of *T. harzianum* (T) obtained from pecan tree rhizosphere, was used to make an inoculum whose substrate was water, sand and wheat straw as described by Lewis and Papavizas (1984), the amount of inoculum was 3 kg (dry weight) per plot. Three other combined treatments were DS+M, DS+T and DS+M+T, depending on the case, first the soil was dried, then the molasses was added and, finally *T. harzianum* was applied.

In each plot, on the third day after applying the molasses, eight PVC tubes were vertically buried equidistantly to a depth of 60 cm. On the fourth and seventh days, half of the tubes were extracted, respectively, and cut into segments of 0-20, 20-40 and 40-60 cm, and frozen until the soil analysis. From each soil segment, a 2:1 water-soil extract was made and pH and ORP were measured.

During September to October of each the years 2013-2015, the incidence of cotton root rot and mortality of the pecan tree was evaluated. When the trees showed wilt leaves were considered sick; while dead trees had dried epidermis of branches and stem. Nevertheless, some diseased pecan trees withered and defoliated after October, but their wood was alive and rebounded the following year; at first, one of these trees was considered dead, but their roots were invaded at the same time by

equidistantemente a 60 cm de profundidad. En el cuarto y séptimo día, la mitad de los tubos se extrajeron, respectivamente, se cortaron en segmentos de 0-20, 20-40 y 40-60 cm y congelaron hasta el análisis del suelo; mediante un extracto agua-suelo 2:1 donde se midieron el pH y el ORP.

De septiembre a octubre de cada año 2013-2015, se evaluó la incidencia de la pudrición texana y la mortalidad de los nogales. Cuando los nogales mostraban hojas marchitas se consideró enfermos; mientras que los árboles muertos, tenían seca la epidermis de ramas y tallos. Sin embargo, algunos nogales enfermos se marchitaron y defoliaron, pero su madera estaba viva y se recuperaron al siguiente año; Al principio, uno de estos árboles se consideró muerto, pero sus raíces estaban invadidas al mismo tiempo por *P. omnivora* y *Trichoderma* sp. Por lo tanto, el resto de los nogales marchitos con su epidermis viva, no fueron removidos y sus raíces tampoco fueron inspeccionadas.

A los datos de pH y ORP del experimento de laboratorio, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (efectos del tratamiento) para mediciones repetidas o tiempo de muestreo (rmANOVA) SAS (1999). En el experimento de campo, el análisis de pH y ORP fue un ANOVA para cada tiempo de muestreo, porque provenía de diferentes muestras. La incidencia y la mortalidad de los árboles de pecana se analizaron cada año por separado mediante un ANOVA. Cuando los análisis estadísticos fueron significativos ($P < 0,001$), la comparación de medias entre tratamientos se realizó con la prueba de rango múltiple de medias de Duncan ($P = 0,05$).

El pH alcanzó hasta 6.2 y se mantuvo en el suelo adicionado con 4.0 mg g⁻¹ de glucosa, las dosis más bajas de glucosa no permitieron un pH tan bajo o solo hasta el segundo día; el suelo sin glucosa mantuvo un pH alrededor de 8. El error estándar de los valores de pH del sobrenadante después de colocar esclerocios de *P. omnivora* aumentó con respecto al sobrenadante sin los esclerocios (Figura 1).

P. omnivora and *Trichoderma* sp. So, the rest of withered pecan trees with their alive epidermis, were not removed and their roots neither were inspected.

A two-way analysis of variance (treatment effects) for repeated measurements or sampling time (rmANOVA) SAS (1999) was applied to the pH and ORP data of the laboratory experiment. In the field experiment, the pH and ORP analysis was an ANOVA for each sampling time, because it came from different samples. The incidence and mortality of pecan trees was analyzed each year separately by an ANOVA. When the statistical analyzes were significant ($P < 0.001$), the mean comparison between treatments was performed with the multiple range test of Duncan means ($P = 0.05$).

A pH of up to 6.2 was reached and maintained in soil amended with 4.0 mg g⁻¹ of glucose, lower doses of glucose did not allow such a low pH or only remained until the second day; the soil without glucose maintained a pH around 8. The standard error of the pH values of the supernatant after placing sclerotia of *P. omnivora* increased with respect to the supernatant without the sclerotia (Figure 1).

The ORP descended only in soil with glucose as time passed, until reaching values of -50 to -250 mV, and it remained around 50 mV in the soil without glucose (Figure 2).

The organic acids detected in the supernatants between days two to five from the soils amended with glucose are indicated in Table 1. The total of VAFs detected from the third day of incubation was almost twice (20 against 11 mmol L⁻¹) in 4.0 versus 2.0 mg g⁻¹ of glucose added in soil; while only <0.2 mmol L⁻¹ was detected from the other organic acids.

The amounts of sulfuric acid to adjust to ~ 4 the pH of the supernatant are shown in Figure 3; only the supernatants obtained from the soils with 2.0 and 4.0 mg g⁻¹ of glucose added exceeded 60 µL and reached near of 180 µL of sulfuric acid.

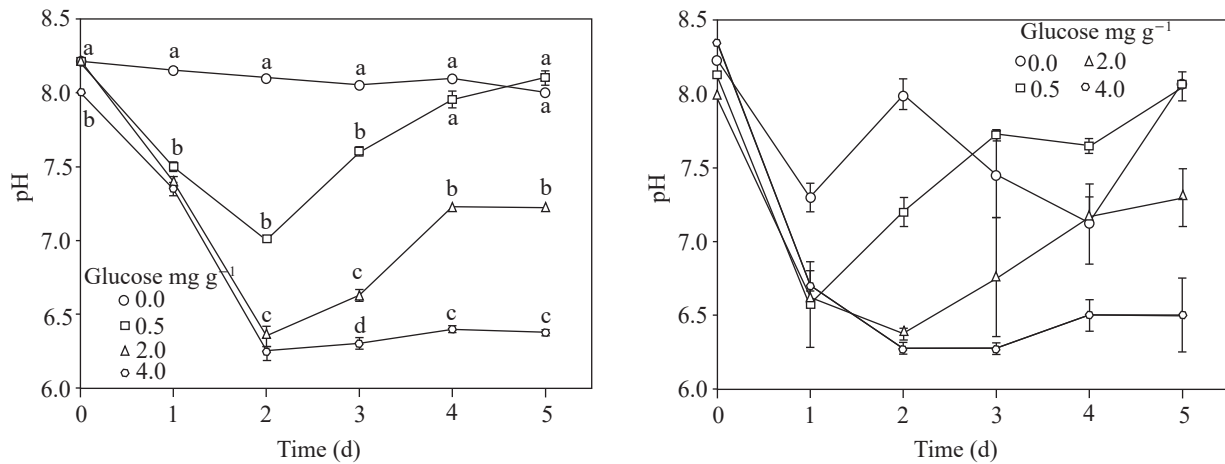


Figura 1. Izquierda, pH del sobrenadante obtenido del suelo con glucosa agregada e inundada hasta 5 d. Derecha, pH del sobrenadante después de colocar 25 esclerocios de *P. omnivora* durante una hora. Barra de error estándar $n=8$, las mismas letras sobre la barra no son significativamente diferentes según la prueba de separación de medios de Duncan ($P>0.05$).

Figure 1. Left, pH of the supernatant obtained from soil with glucose added and flooded up to 5 d. Right, pH of the supernatant after placing 25 sclerotia of *P. omnivora* for one hour. Standard error bar $n=8$, the same letters above the bar are not significantly different according to the Duncan media separation test ($P>0.05$).

El ORP descendió solo en el suelo con glucosa a medida que pasaba el tiempo, hasta alcanzar valores de -50 a -250 mV, y permaneció alrededor de 50 mV en el suelo sin glucosa (Figura 2).

The pH values of the supernatants adjusted to pH ~ 4 and those reached in the supernatants where sclerotia of *P. omnivora* remained are shown in Figure 4; the pH of these last supernatants had

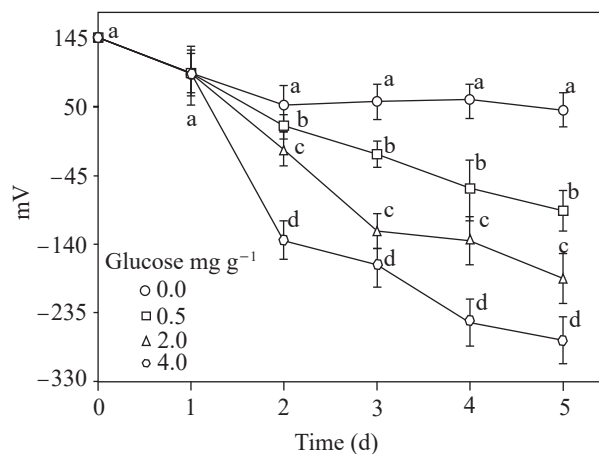


Figura 2. Potencial oxidación-reducción (mV) del sobrenadante obtenido del suelo con glucosa agregada e inundado hasta 5 d. Barra de error estándar $n=8$, las mismas letras sobre la barra no son significativamente diferentes, según la prueba de separación de medios de Duncan ($P>0.05$).

Figure 2. Oxidation-reduction potential (mV) of the supernatant obtained from soil with glucose added and flooded up to 5 d. Standard error bar $n=8$, the same letters above the bar are not significantly different according to the Duncan media separation test ($P>0.05$).

Los ácidos orgánicos detectados en los sobrenadantes entre los días dos y cinco de los suelos adicionados con glucosa se indican en la Cuadro 1. El total de VAFs detectados desde el tercer día de incubación fue casi dos veces (20 contra 11 mmol L⁻¹) en 4.0 versus 2.0 mg g⁻¹ de glucosa agregada en el suelo; y solo <0.2 mmol L⁻¹ fue detectado de otros ácidos orgánicos.

Las cantidades de ácido sulfúrico para ajustar a ~4 el pH del sobrenadante se muestran en la Figura 3; solo los sobrenadantes obtenidos de los suelos con 2.0 y 4.0 mg g⁻¹ de glucosa agregada excedieron los 60 µL y alcanzaron cerca de 180 µL de ácido sulfúrico.

Los valores de pH de los sobrenadantes ajustados a pH ~4 y los alcanzados en los sobrenadantes donde permanecieron esclerocios de *P. omnivora* se muestran en la Figura 4; el pH de estos últimos oscilaron alrededor de 4.5 a 2.5, en contraste con el

values that ranged from about 4.5 to 2.5, in contrast with the pH of the supernatants without sclerotia with pH values of 4.2 to 3.9.

The sclerotia of *P. omnivora* survived between 90 to 100% in the supernatants where the pH was not adjusted, in contrast with a survival of 0 to 20% of the sclerotia that remained one hour in supernatants obtained from soil with 2.0 and 4.0 mg g⁻¹ of glucose added, two days of flooding and which pH was adjusted ~4, (Figure 5). The percentage of moisture in the soils where treatments were applied showed that the humidity ranged from 6.8 to 9.6, from 9.6 to 11.1 and from 10.9 to 11.6% in the depths of 0-20, 20-40 and 40-60 cm in non-dried soils, respectively; while in dried soils the humidity was 1.7 to 3.9%.

In the treatments where molasses was added to the soil, the average pH ranged from 7 to 6.5, but where the molasses was not added was from 7 to

Cuadro 1. Ácidos grasos volátiles y otros ácidos orgánicos, detectados en sobrenadantes obtenidos del suelo con dosis agregadas de glucosa-suelo de 0.0, 2.0 y 4.0 mg g⁻¹ e inundadas hasta cinco días.

Table 1. Volatile fatty acids and other organic acids, detected in supernatants obtained from soil with 0.0, 2.0 and 4.0 mg g⁻¹ glucose-soil doses added and flooded up to five days.

Dose mg g ⁻¹	Day	Acids ^z in mmol L ⁻¹						Total mmol L ⁻¹	
		Volatile fatty acids			Other organic acids			Volatile	Other
		AA	AB	AF	AC	AL	AS		
0	5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2	2	4.85	Nd	0.93	0.01	0.02	Nd	5.78	0.03
	3	9.71	Nd	Nd	Nd	0.01	Nd	9.82	0.01
	4	9.68	0.14	Nd	0.01	Nd	Nd	11.00	Nd
	5	11.15	0.08	Nd	Nd	0.01	Nd	11.23	0.01
4	2	6.23	0.07	1.37	0.02	0.09	0.01	7.67	0.11
	3	18.23	Nd	0.09	Nd	Nd	0.015	18.31	0.01
	4	20.06	Nd	0.07	0.01	0.04	0.051	20.12	0.10
	5	22.02	Nd	0.09	0.01	0.02	0.038	22.10	0.07

^z Ácidos, AA = acético; AB = butírico; AF = fórmico; AC = cítrico; AL = láctico; AS = succínico / ^z Acids, AA = acetic; AB = butyric; AF = formic; AC = citric; AL = lactic; AS = succinic.
Nd = No detectado / Nd = No detected.

pH de los sobrenadantes sin esclerocios fluctuaron de 4.2 a 3.9.

Los esclerocios de *P. omnivora* sobrevivieron entre 90 y 100% en los sobrenadantes en los que no se ajustó el pH, en contraste, una supervivencia del 0 al 20% de los esclerocios que permanecieron una hora en sobrenadantes obtenidos del suelo con 2.0 y 4.0 mg g⁻¹ de glucosa añadida, con dos días de inundación y cuyo pH se ajustó ~ 4, (Figura 5). El porcentaje de humedad en los suelos no desecados y donde se aplicaron tratamientos osciló de 6.8 a 9.6, de 9.6 a 11.1 y de 10.9 a 11.6% en las profundidades de 0-20, 20-40 y 40-60 cm, respectivamente; mientras que en suelos desecados la humedad fue de 1.7 a 3.9%.

En tratamientos donde se agregó melazas al suelo, el pH promedio varió de 7 a 6.5, pero donde no se agregó fue de 7 a 7.5. Los rangos promedio de ORP de -20 a -60 mV se observaron en tratamientos de suelo sin melaza, pero en suelos con melaza, los rangos de ORP fueron de -120 a -200 mV. Los tratamientos (M) suelos con melaza agregada, el pH mínimo fue de 6.4, pero donde no se agregó la

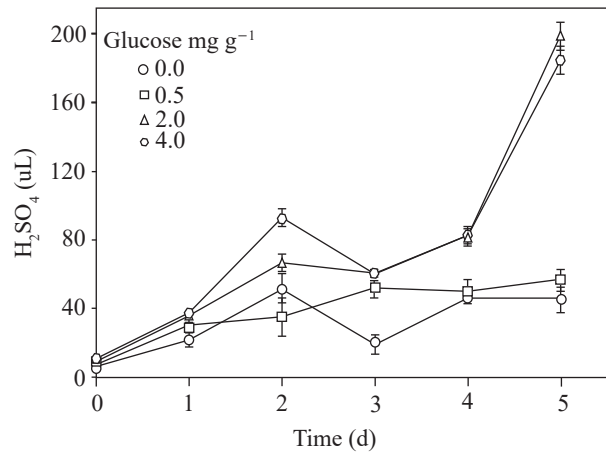


Figura 3. Ácido sulfúrico utilizado para ajustar el pH (~ 4) del sobrenadante obtenido del suelo con glucosa agregada e inundado hasta 5 d. Barra de error estándar $n=8$.

Figure 3. Sulfuric acid used to adjust the pH (~ 4) of the supernatant obtained from soil with glucose added and flooded up to 5 d. Standard error bar $n=8$.

7.5. Average ORP ranges from -20 to -60 mV were observed in soil treatments without molasses, in contrast in soils amended with molasses the ORP ranges were from -120 to -200 mV. The treatments

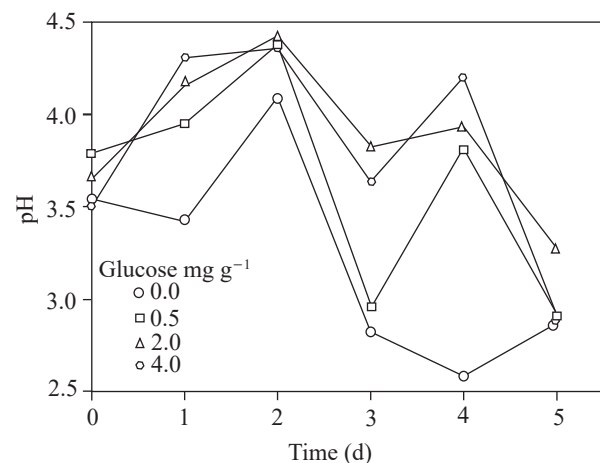
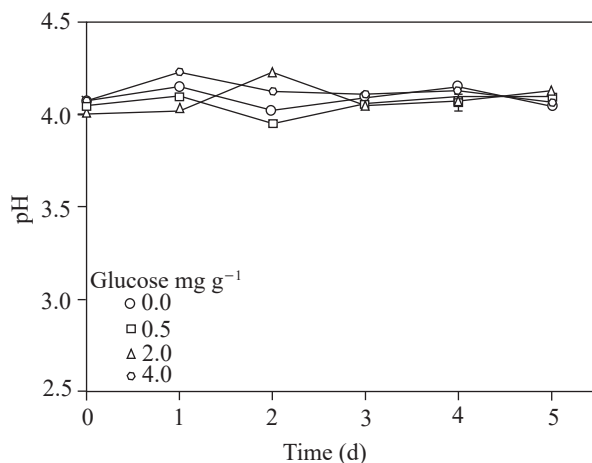


Figura 4. Izquierda, pH ajustado a ~ 4 del sobrenadante obtenido del suelo con glucosa agregada e inundado hasta 5 d. A la derecha, pH del sobrenadante después de colocar 25 esclerocios de *P. omnivora* durante 1 h.

Figure 4. Left, pH adjusted to ~ 4 of the supernatant obtained from soil with glucose added and flooded up to 5 d. Right, pH of the supernatant after placing 25 sclerotia of *P. omnivora* for 1 h.

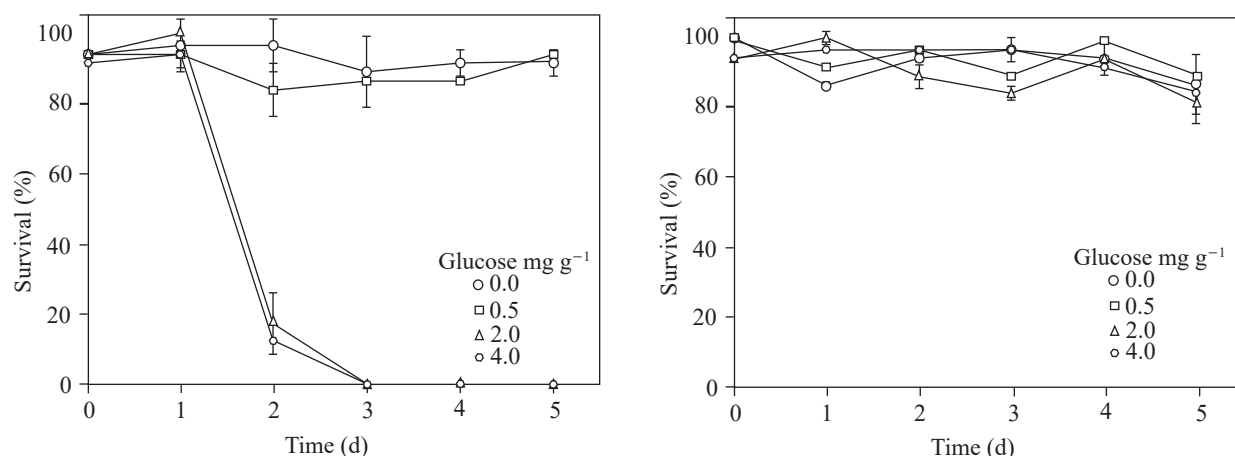


Figura 5. Supervivencia de los esclerocios de *P. omnivora* en los sobrenadantes, donde el pH no se ajustó (derecha) o donde el pH se ajustó a ~ 4 (izquierda). Ambos sobrenadantes se obtuvieron del suelo con glucosa agregada e inundado hasta 5 d. Barra de error estándar $n=8$.

Figure 5. Survival of the sclerotia of *P. omnivora* in the supernatants, where the pH was not adjusted (right) or where the pH was adjusted to ~ 4 (left). Both supernatants were obtained from soil with glucose added and flooded up to 5 d. Standard error bar $n=8$.

melaza (C) fue de 7.3; mientras que en tratamientos similares, el ORP mínimo de -60 mV y -200 mV, respectivamente. (Figura 6).

(M) where molasses was added to the soils the minimum pH was 6.4, but where the molasses was not added (C) was 7.3; while in similar treatments,

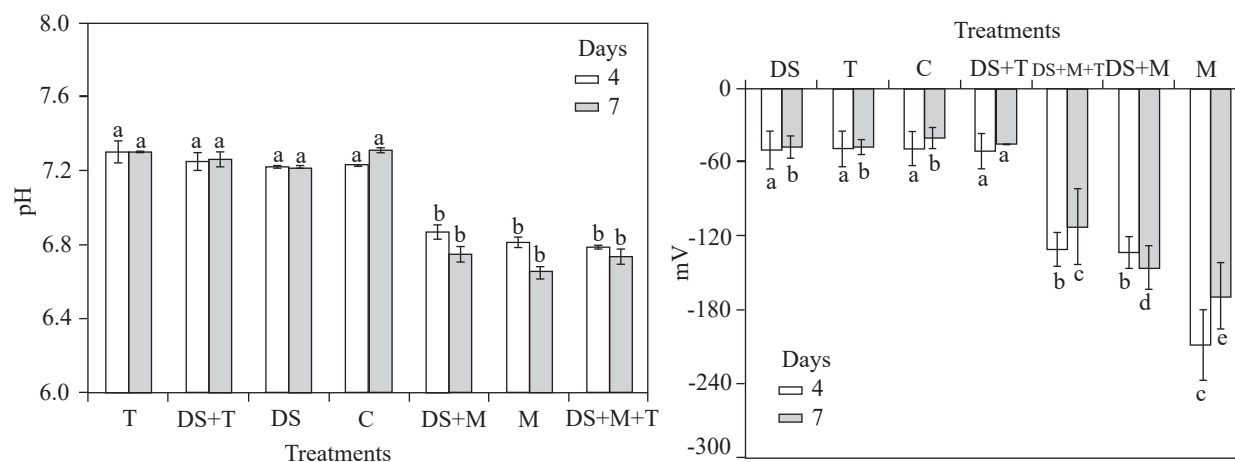


Figura 6. Izquierda, cambios en pH y derecha, cambio de ORP (mV). Ambos cambios después de cuatro o siete días para los tratamientos con melaza (M), con *T. harzianum* (T), suelo desecado (DS), sin tratamiento o control (C) y combinaciones (DS+T, DS+M y DS+T+M). Barra de error estándar $n=4$, las mismas letras sobre la barra no son significativamente diferentes según la prueba de separación de medios de Duncan ($P>0.05$).

Figure 6. Left, changes in pH and right, ORP change (mV). Both changes after four or seven days for the treatments of with Molasses (M), with *T. harzianum* (T), dried soil (DS), no treatment or control (C) and combinations (DS+T, DS+M and DS+T+M). Standard error bar $n = 4$, the same letters above the bar are not significantly different according to the Duncan media separation test ($P>0.05$).

Para cada año, no hubo diferencias significativas en incidencia y muerte de los nogales. En 2013, no se detectaron nogales con síntomas de pudrición texana ni muertos. Para 2014, la incidencia de la enfermedad fue de 2 a 48% y para 2015 de 27 a 69%. La mortandad de los nogales varió de 2 a 29 y de 27 a 54%, en los años 2014 y 2015, respectivamente. El tratamiento DS+T+M tuvo la menor incidencia y mortandad de nogales, con 0, 2 y 27% para los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente.

La RSD puede inducirse con residuos de cultivos, fertilizantes o materiales orgánicos que proporcionen C orgánico para los microorganismos del suelo; sustratos utilizados tan diversos como melaza, glucosa, etanol, salvado y pajas de cereales, residuos de canola (*Brassica napus*), orujo de uva, alfalfa, semillas de mostaza (*Brassica juncea*), residuos de pasto, excreta líquida de cerdo, entre otros (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana y Mazzola, 2016; Shrestha *et al.*, 2016).

Cuando las fuentes de C son residuos de cultivos o abono verde, las cantidades que se usan generalmente para RSD varían de 20 a 40 t ha⁻¹, lo que permite el control de hongos, bacterias, nematodos y malezas (Katase *et al.*, 2009; Shrestha *et al.*, 2016; Shennan *et al.*, 2014).

Dos indicadores del proceso de RSD son cambios de acidez de pH (<7) y ORP reductivos (-200 mV) (Momma, 2008); estos cambios se observaron en este trabajo, tanto en suelos agregados con glucosa como con melazas. En este trabajo, la cantidad de C agregada como glucosa (2.0-4.0 mg g⁻¹) que indujo la muerte de los esclerocios de *P. omnivora* fue consistente con trabajos previos (Liu *et al.*, 2016; Samaniego-Gaxiola, 1994) y concordó con el C (4 mg C g⁻¹) calculada para el control de otros fitopatógenos en suelo (Shennan *et al.*, 2014). El ácido acético en solución necesario para matar más del 50% de los esclerocios de *P. omnivora* en un período de tiempo entre 5 y 1 h fue de 17

the minimum ORP of -60 mV and -200 mV, respectively (Figure 6).

For each year, there was no significant difference for incidence and death of pecan trees. In 2013, neither pecan trees were detected with symptoms of cotton root rot, nor any died. For 2014, the incidence of the disease was 2 to 48% and for 2015 was 27 to 69%. The mortality of pecan trees ranged from 2 to 29 and 27 to 54%, in the years 2014 and 2015, respectively. The DS+T+M treatment had the lowest incidence and mortality of pecan trees, with 0, 2, and 27% for the years 2013, 2014, and 2015, respectively.

The RSD can be induced with crop residues, fertilizers or organic materials that provide a source or input of organic C for soil microorganisms; some substrates are as diverse as molasses, glucose, ethanol, bran and cereal straws, canola residues (*Brassica napus*), grape marc, alfalfa, mustard seeds (*Brassica juncea*), grass residues, liquid pig manure, among others (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana and Mazzola, 2016; Shrestha *et al.*, 2016).

When C sources are crop residues or green manure, the amounts that are usually used for RSD range from 20 to 40 t ha⁻¹, which allows the control of fungi, bacteria, nematodes and weeds (Katase *et al.*, 2009; Shrestha *et al.*, 2016; Shennan *et al.*, 2014).

Two indicators of the RSD process are changes in pH towards acidity (<7) and ORP towards reductive (-200 mV) (Momma, 2008); these changes were observed in this work, both in soil added with glucose and with molasses. In this work, the amount of C added as glucose (2.0-4.0 mg g⁻¹) necessary to induce the death of the sclerotia of *P. omnivora* was consistent with previous works (Liu *et al.*, 2016; Samaniego-Gaxiola, 1994) and according to the amount of C (4 mg C g⁻¹) calculated for the control of other plant pathogens in soil (Shennan

a 33 mmol L⁻¹, respectivamente (Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013); en contraste, en este estudio, observamos que el 80% de los esclerocios murieron en 1 h después de permanecer en los sobrenadantes a pH ~ 4 que contenían de 5,8 a 22 mmol L⁻¹ de VAFs (Cuadro 1 y Figura 5). Esto sugiere que los sobrenadantes pueden contener otros compuestos tóxicos para los esclerocios y que el pH debe ajustarse para que estos compuestos aumenten su toxicidad. Otros compuestos orgánicos como el alil isotiocianato, sulfuros, disulfuros y trisulfuros se producen en la RSD utilizando semillas de mostaza, que han demostrado ser antifúngicas y nematocidas (Hewavitharana *et al.*, 2014); así como los iones Fe²⁺ y Mn²⁺ son igualmente tóxicos en condiciones RSD para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Momma *et al.*, 2011). En concordancia con Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval (2013); Tenuta *et al.* (2002); Tenuta y Lazarovits (2002), la ecuación de Henderson-Hasselbalch predice la toxicidad y las formas químicas de los VAFs, del ácido nitroso y del amoníaco en función del pH. Adicionalmente, la RSD permitió el control de hongos fitopatógenos si los VAFs, pasaban a ácido nitroso y el amoníaco en un pH ≤ 5 y un pH ≥ 8, respectivamente, Lazarovits (*et al.*, 2005). Lo último, también concuerda con nuestros resultados, donde los esclerocios solo murieron en los sobrenadantes donde se ajustó el pH ~ 4.

Tres veces más ácido sulfúrico se necesitó para ajustar el pH ~ 4 de los sobrenadantes con 0.0 y 0.5 que con 2 y 4 mg g⁻¹ de glucosa agregada en el suelo (Figura 3) ello apunta a la formación de compuestos con la capacidad de amortiguadora de pH, además de los VAFs. Asimismo, los cambios en el pH observados en las soluciones donde permanecieron los esclerocios (Figura 4) sugieren que responden a la modificación del pH de su entorno, previamente consignado (Samaniego-Gaxiola, 2013).

et al., 2014). The acetic acid in solution necessary to kill more than 50% of sclerotia of *P. omnivora* in a period of time between 5 and 1 h was from 17 to 33 mmol L⁻¹, respectively (Samaniego-Gaxiola and Balagurusamy, 2013); in contrast, in this study, we observed that 80% of the sclerotia died in 1 h after remaining in the supernatants at pH ~ 4 that contained 5.8 to 22 mmol L⁻¹ of VAFs (Table 1 and Figure 5). This suggests that the supernatants may contain other toxic compounds to sclerotia and that the pH needs to be adjusted so that these compounds increase their toxicity. Other organic compounds such as allyl isothiocyanate, sulfides, disulfides and trisulfides are produced with the RSD using mustard seeds, which have been shown to be antifungal and nematocidal (Hewavitharana *et al.*, 2014); as well as the Fe²⁺ and Mn²⁺ ions are equally toxic under RSD conditions for *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Momma *et al.*, 2011). In concordance with Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013); Tenuta *et al.* (2002); Tenuta and Lazarovits (2002) the Henderson-Hasselbalch equation predicts the toxicity and chemical forms of the VAFs, nitrous acid and ammonia as a function of pH. Additionally, in Lazarovits *et al.* (2005) the RSD allowed the control of phytopathogenic fungi if the VAFs, nitrous acid and the ammonia were in a pH ≤ 5 and pH ≥ 8, respectively. The latter, is also in concordance with our results, where the sclerotia only died in the supernatants where the pH was adjusted ~ 4.

Three times more sulfuric acid was needed to adjust to the pH ~ 4 of the supernatants with 0.0 and 0.5 than with 2 and 4 mg g⁻¹ of glucose added in soil (Figure 3) which points to the formation of compounds with the ability to buffer pH, in addition to the VAFs. Likewise, the changes in pH observed in the solutions where the sclerotia remained (Figure 4) suggest that they respond to

En el campo, los suelos con o sin melaza mostraron diferencias en pH y ORP (Figura 6). Si bien, durante el primer año no hubo síntomas de nogales enfermos, en los años siguientes observamos lo contrario, posiblemente debido a la colonización de las raíces por *P. omnivora* fuera del suelo tratado y la restauración de una condición favorable para ello. Los nogales del huerto de Hormiguero, durante los tres años de nuestro trabajo de campo, ninguno de los nogales adultos murió, sin embargo, en un vivero alrededor de nuestro lugar de trabajo, 179 (11% de 1504) de nogales murieron por la pudrición texana (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2014). Lo que sugiere que *Phymatotrichopsis* está ampliamente distribuida en el suelo de Hormiguero, pero el nogal adulto tolera su ataque y sobrevive pero el árbol joven no. Esto explicaría por qué los nogales adultos del de Hormiguero no murieron durante los tres años de este estudio. Aunque, este trabajo no tuvo el alcance para evaluar el papel de *Trichoderma* spp. en suelo de la huerta, la colonización de *Trichoderma* sobre cordones de *P. omnivora* y las raíces de los nogales fue evidente; en contraste, la muerte de nogales durante el tercer año fue de 27-54% (Figura 7) muy por encima del 11% mencionado, lo que sugiere que ninguno de nuestros tratamientos tuvo efecto en la protección de los nogales contra *P. omnivora*.

En La Laguna, México, en el suelo de huertos de nogal, es común encontrar especies de *Trichoderma* (Samaniego-Gaxiola y Chew-Madinaveitia, 2007) e incluso en las raíces o en la rizósfera (inédito). Si bien, no hubo diferencias significativas en ningún año en la incidencia y muerte de los nogales, los tratamientos con *Trichoderma* tuvieron la incidencia más baja de la enfermedad (Figura 7). Es posible que *T. harzianum* utilizado en este trabajo u otros *Trichoderma* nativos, se conviertan en antagonistas de *P. omnivora*, colonicen permanentemente el suelo y raíces o los árboles adquieran

the modification of the pH from their environment, which has been previously reported (Samaniego-Gaxiola, 2013).

In the field, soils with or without molasses showed differences in pH and the ORP (Figure 6). Although, during the first year there was no symptom of the disease in the pecan trees, in the following years we observed the opposite, possibly due to the colonization of the roots by *P. omnivora* outside the treated soils and the restoration of a favorable condition for it. In the pecan trees from the orchard Hormiguero, during the three years of our field work none of the adult pecan trees died, however, in a nursery around our workplace, 179 (11% of 1504) pecan trees died by the cotton root rot (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2014). Which suggests that the *Phymatotrichopsis* is widely distributed in the soil of Hormiguero orchard, but the adult pecan tree tolerates its attack and survives and the young tree does not. This would explain why the adult trees from the Hormiguero orchard did not die during the three years of this study. Although, this work did not have the scope to assess the role of *Trichoderma* spp. in orchard soils, the colonization of *Trichoderma* over *P. omnivora* strands, and tree roots was evident, in contrast, the pecan tree death of pecan trees for the third year was 27-54% (Figure 7) well above the 11% indicated, which suggests that none of our treatments had effect in protecting the pecan tree from *P. omnivora*.

In La Laguna, Mexico, in soil of pecan tree orchards, it is common to find species of *Trichoderma* (Samaniego-Gaxiola y Chew-Madinaveitia, 2007) and even on the roots or in the rhizosphere (unpublished). Although, there was no significantly difference in any year for incidence and death of pecan trees, *Trichoderma* treatments had the lowest incidence of the disease (Figure 7). It is possible that *T. harzianum* used in this work or other native *Trichoderma*, become antagonists

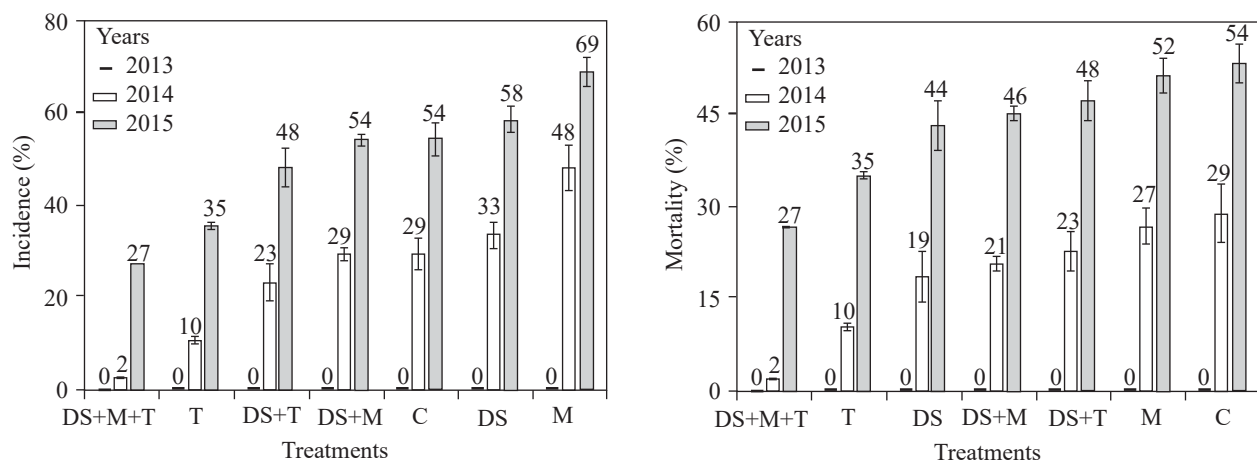


Figura 7. Incidencia de pudrición texana (izquierda) y mortandad de árboles (derecha) en tratamientos aplicados al suelo de Melaza (M), *T. harzianum* (T), suelo desecado (DS), sin tratamiento o control (C) y las combinaciones (DS+T, DS+M y DS+M+T). La barra de error estándar $n=4$, el número sobre la barra indica el porcentaje de incidencia y muerte de los nogales.

Figure 7. Incidence of cotton root rot (left) and tree mortality (right) in the treatments applied to the Molasses soil (M), with *T. harzianum* (T), dried soil (DS), no treatment or control (C) and the combinations (DS+T, DS+M and DS+M+T). Standard error bar $n=4$, number above the bar indicates the percentage of incidence and death of pecan trees.

resistencia al ataque del fitopatógeno; aunque estas relaciones estaba fuera del alcance de este trabajo y aún se está investigando, fue evidente la presencia de *T. harzianum* en el suelo y en las raíces del nogal, que inicialmente se consideró muerto (Figura 8).

Shrestha *et al.* (2013) encontraron que con RSD los *Sclerotium rolfsii* Sacc. se colonizaron entre 93-94% por *Trichoderma* spp. nativos del suelo. En consecuencia, los hongos y las bacterias antagonistas de los hongos fitopatógenos en el suelo podrían establecerse después de la RSD, lo cual es un beneficio potencial de este método. Esta idea está respaldada por RSD donde se eliminó patógenos y modificó la biota del suelo, con antagonistas de los fitopatógenos y al ciclo de nutrientes benéficos para el crecimiento de los cultivos (Huang *et al.*, 2015). Si bien, el aporte de C utilizado en la RSD y el subsecuente establecimiento de cultivos, determinará el tipo de microbiota dominante en el suelo (Huang *et al.*, 2016); es decir, la adición de fuentes de C en la RSD, induce un cambio de microbiota en el suelo,

of *P. omnivora*, permanently colonize the soil and roots or pecan tree acquire resistance to the attack of the phytopathogen; although these relationships were as beyond the scope of this work and it is still under investigation, it was evident the presence of *T. harzianum* in the soil and on the roots of the pecan tree, which was initially considered as dead (Figure 8).

Shrestha *et al.* (2013) found that after the RSD, sclerotia of *Sclerotium rolfsii* Sacc. were colonized between 93-94% by *Trichoderma* spp. natives of the soil. Consequently, fungi and antagonistic bacteria of phytopathogenic fungi in the soil could be established after the RSD, which is a potential benefit of this method. This idea is supported by studies, where RSD eliminated pathogens and modified soil biota by favoring antagonists of the phytopathogens and the beneficial nutrient cycle for crop growth (Huang *et al.*, 2015). Although, the input of C used in the RSD and subsequent establishment of crops, will determine the type

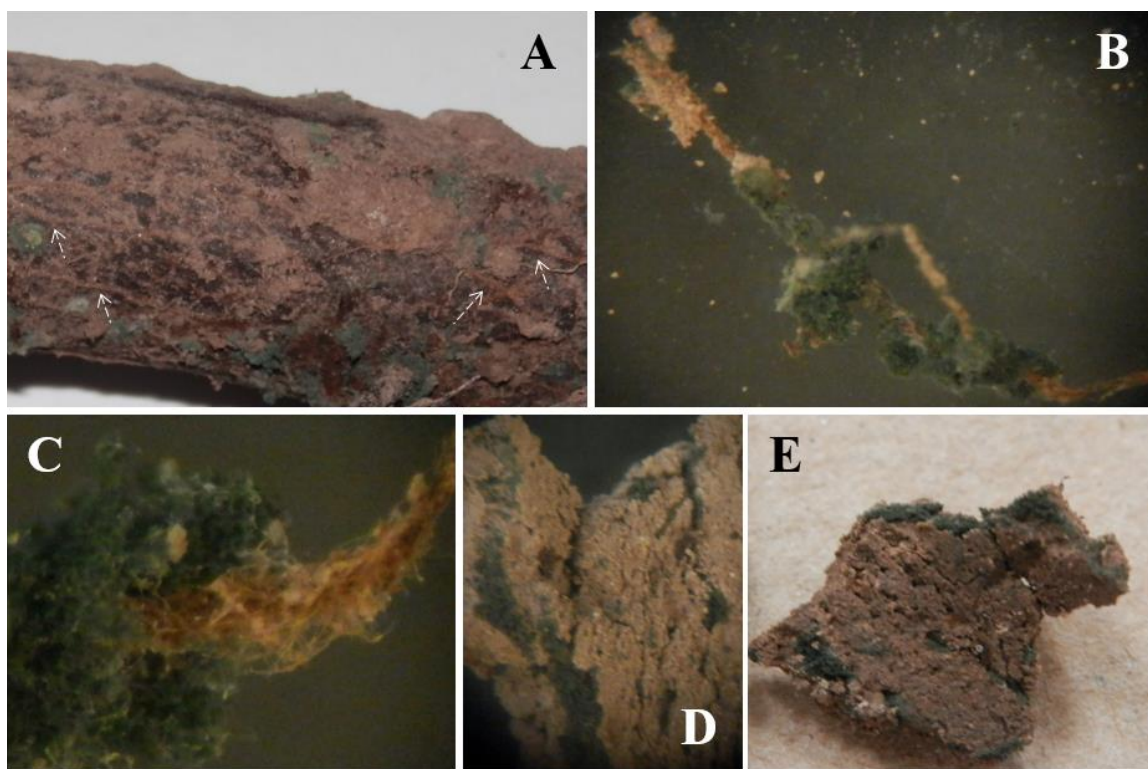


Figura 8. *Trichoderma* sp. en la raíz del nogal y cordones de *P. omnivora* y en suelo. A. Cordones en las raíces (flechas blancas), las áreas verdes son *Trichoderma* sp. sobre cordones y raíces. B y C. *Trichoderma* sp. envolviendo los cordones. D y E. Cordones envueltos por *Trichoderma* sp. dentro de las grietas del suelo.

Figure 8. *Trichoderma* sp. on pecan tree root, strands of *P. omnivora* and in soil. A. Strands on roots (white arrows), green areas are *Trichoderma* sp. over strands and roots. B and C. *Trichoderma* sp. wrapping the strands. D and E. Strands wrapped by *Trichoderma* sp. inside the cracks of the soil.

lo que depende tanto de la fuente de C como de la microbiota nativa del cultivo. Una modalidad de la RSD es usar varios sustratos como fuente de C para el control de un solo patógeno (*Phytophthora nicotianae*) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017).

Según Liu *et al.* (2018) después de la RSD fue posible reducir las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. en el suelo cultivado con sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai), también se redujo significativamente el marchitamiento causado por *F. oxysporum*; pero las poblaciones del patógeno se restauraron cuando la sandía se sembró en un segundo ciclo, la enfermedad se restableció y se favoreció el aumento de otros patógenos del cultivo como *Monosporascus*. En nuestro caso, *P.*

of dominant microbiota in the soil (Huang *et al.*, 2016); that is, the addition of sources of C in the RSD, induces a change of microbiota in the soil, but this also depends on both the C source and the native microbiota of the crop that will be established. An additional modality of the RSD is to use several substrates as a source of C for the control of a single pathogen (*Phytophthora nicotianae*) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017).

According to Liu *et al.* (2018) after RSD it was possible to reduce the populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil cultivated with watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum and Nakai) also, the wilt caused by *F. oxysporum* was significantly reduced; but the populations

omnivora posiblemente recoloniza el suelo a partir del segundo año, donde los cordones fueron evidentes en las raíces del nogal.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo SAGARPA-CONACYT mediante financiamiento a través del proyecto clave 2011-13-175247. Asimismo, a Daniela Samaniego Castruita por revisar el manuscrito y su versión en inglés.

LITERATURA CITADA

- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (Sistema de Centros Públicos de Investigación CONACYT). 2018. La nuez pecanera en México. Disponible en línea: <https://centrosconacyt.mx/objeto/nuez-pecanera/>
- Conn KL, Tenuta M and Lazarovits G. 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95(1):28-35. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-0028>
- Herrera-Pérez T y Samaniego-Gaxiola JA. 2002. Enfermedades del nogal. Pp. 177-206. En: Arreola, AA y Reyes JI (eds). Tecnología de Producción del Nogal Pecanero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental La Laguna. Matamoros, Coahuila, México. 220 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1967/Tecnologia%20de%20produccion%20de%20nogal%20pecanero.pdf?sequence=1>
- Hewavitharana SS, and Mazzola M. 2016. Carbon source-dependent effects of anaerobic soil disinfestation on soil microbiome and suppression of *Rhizoctonia solani* AG-5 and *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology* 106(9):1015-1028. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0329-R>
- Hewavitharana SS, Ruddell D, and Mazzola M. 2014. Carbon source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. *European Journal of Plant Pathology* 140(1):39-52. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0442-5>
- Huang X, Liu L, Wen T, Zhu R, Zhang J and Cai Z. 2015. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation. *Microbiological research* 181:33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.004>
- Huang X, Liu L, Wen T, Zhang J, Wang F and Cai Z. 2016. Changes in the soil microbial community after reductive soil disinfestation and cucumber seedling cultivation. *Applied microbiology and biotechnology* 100(12):5581-5593. DOI 10.1007/s00253-016-7362-6
- Katase M, Kubo C, Ushio S, Ootsuka E, Takeuchi T and Mizukubo T. 2009. Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfestation.

of the pathogen were restored when watermelon was planted in a second cycle, the disease was reestablished and the increase of other crop pathogens such as *Monosporascus* was favored. In our case, *P. omnivora* possibly recolonizes the soil from the second year, where the strands were evident on the roots of the pecan tree.

ACKNOWLEDGMENT

To the fund SAGARPA-CONACYT by financing through the key project 2011-13-175247. Also, to Daniela Samaniego Castruita for revising the manuscript and its version in English.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Nematological Research 39(2):53-62. [https://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veg-hort/asd/Nematicidal\\_activity\\_volatile\\_fatty\\_acids\\_SD.pdf](https://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/veg-hort/asd/Nematicidal_activity_volatile_fatty_acids_SD.pdf)
- Lazarovits G, Conn KL, Abbasi PA and Tenuta M. 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. *Acta Horticulturae* 698:215. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.698.29>
- Lewis JA and Papavizas GC. 1984. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* 74(10):1240-1243. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Articles/Phyto74n10\\_1240.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Articles/Phyto74n10_1240.pdf)
- Liu L, Chen S, Zhao J, Zhou X, Wang B, Li Y, Zheng G, Zhang J, Cai Z and Huang X. 2018. Watermelon planting is capable to restructure the soil microbiome that regulated by reductive soil disinfestation. *Applied Soil Ecology* 129:52-60. [https://www.researchgate.net/profile/Jun\\_Zhao33/publication/325028296\\_Watermelon\\_planting\\_is\\_capable\\_to\\_restructure\\_the\\_soil\\_microbiome\\_that\\_regulated\\_by\\_reductive\\_soil\\_disinfestation/links/5b2c7922a6fdcc8506bc861e/Watermelon-planting-is-capable-to-restructure-the-soil-microbiome-that-regulated-by-reductive-soil-disinfestation.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jun_Zhao33/publication/325028296_Watermelon_planting_is_capable_to_restructure_the_soil_microbiome_that_regulated_by_reductive_soil_disinfestation/links/5b2c7922a6fdcc8506bc861e/Watermelon-planting-is-capable-to-restructure-the-soil-microbiome-that-regulated-by-reductive-soil-disinfestation.pdf)
- Liu L, Kong J, Cu, H, Zhang J, Wang F, Cai Z and Huang X. 2016. Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of *Fusarium oxysporum* and microbial communities during reductive soil disinfestation. *Biological Control* 101:103-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.011>
- Momma, N. 2008. Biological soil disinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *Japan*

- Agricultural Research Quarterly 42(1):7-12. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarq/42/1/42\\_7/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jarq/42/1/42_7/_pdf)
- Momma N, Kobara Y and Momma M. 2011. Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfestation. *Journal of General Plant Pathology* 77(6):331-335. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-011-0336-8>
- Momma N, Yamamoto K, Simandi P and Shishido M. 2006. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). *Journal of General Plant Pathology* 72(4):247-252. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-006-0274-z>
- Samaniego-Gaxiola JA. 1994. Viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dugg. en suelos inundados y complementados con glucosa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 12(1):125-133.
- Samaniego-Gaxiola, JA. 2008. Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* Dugg Hennebert II expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26(1):32-39. <http://www.redalyc.org/html/612/61226106/>
- Samaniego GJA. 2013. Supervivencia de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* en función del pH in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(3):337-351. <http://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/2631/263127575001/1>
- Samaniego-Gaxiola, JA and Balagurusamy N. 2013. Survival of soil-borne fungus *Phymatotrichopsis omnivora* after exposure to volatile fatty acids. *Journal of General Plant Pathology* 79(2):105-109. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-013-0436-8>
- Samaniego-Gaxiola JA y Chew-Madinaveitia Y. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78(2):383-390. <http://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/407/377>
- Samaniego-Gaxiola JA, Fontes-Puebla AA, Tarango-Rivero SH y Pedroza-Sandoval A. 2014. Comportamiento de la Pudrición Texana (*Phymatotrichopsis omnivora*) en Viveiro de Nogales. *Revista mexicana de fitopatología* 32(1):26-37. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3212014/Articulos/ComportamientodelaPudricionTexana.pdf>
- Samaniego GJA, Ordóñez MHJ, Pedroza SA y Cueto-Wong C. 2010. Relationship between the drying of the sclerotia of *Phymatotrichopsis omnivora* and its survival. *Revista Mexicana de Micología* 32(1):49-58. <http://www.redalyc.org/pdf/883/88319899006.pdf>
- Samaniego-Gaxiola JA y Pedroza-Sandoval A. 2013. Usos potenciales de los ácidos grasos volátiles en suelo, agua y aire. *Terra Latinoamericana* 31(2):155-163. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792013000300155](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000300155)
- Serrano-Pérez P, Roskopf E, De Santiago A and Rodríguez-Molina MC. 2017. Anaerobic soil disinfestation reduces survival and infectivity of *Phytophthora nicotianae* chlamydospores in pepper. *Scientia horticultrae* 215:38-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.003>
- Shennan C, Muramoto J, Lamers J, Mazzola M, Roskopf EN, Kokalis-Burelle N, Momma N, Butler DM and Kobara Y. 2014. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. In VIII International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation 1044:165-175. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1044.20>
- Shrestha U, Ownley BH, Roskopf EN, Dee ME and Butler DM. 2013. Optimization of amendment C: N ratio in anaerobic soil disinfestation for control of *Sclerotium rolfsii*. In Proceedings of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, San Diego, CA. 14-1. [https://www.researchgate.net/profile/Utsala\\_Shrestha/publication/309479087\\_OPTIMIZATION\\_OF\\_AMENDMENT\\_CN\\_RATIO\\_IN\\_ANAEROBIC\\_SOIL\\_DISINFESTATION\\_FOR\\_CONTROL\\_OF\\_SCLEROTIUM\\_ROLFSII/links/581248b108ae1f5510c2a2cd/OPTIMIZATION-OF-AMENDMENT-CN-RATIO-IN-ANAEROBIC-SOIL-DISINFESTATION-FOR-CONTROL-OF-SCLEROTIUM-ROLFSII.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Utsala_Shrestha/publication/309479087_OPTIMIZATION_OF_AMENDMENT_CN_RATIO_IN_ANAEROBIC_SOIL_DISINFESTATION_FOR_CONTROL_OF_SCLEROTIUM_ROLFSII/links/581248b108ae1f5510c2a2cd/OPTIMIZATION-OF-AMENDMENT-CN-RATIO-IN-ANAEROBIC-SOIL-DISINFESTATION-FOR-CONTROL-OF-SCLEROTIUM-ROLFSII.pdf)
- Shrestha U, Augé RM and Butler DM. 2016. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. *Frontiers in Plant Science* 7 article 1254:1-20. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01254>
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 1999. SAS.
- Tenuta M, Conn KL and Lazarovits G. 2002. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92(5):548-552. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2002.92.5.548>
- Tenuta M and Lazarovits G. 2002. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92(3):255-264. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.3.255>