

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLÚMEN 34, NÚMERO 1, 2016



Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA
SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A. C.

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera Colegio de Postgraduados

Editor Técnico * Technical Editor

Lic. Ma. Yunuén López Muratalla

Composición Web * Web Composition

Ing. Eduardo Guzmán Hernández

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía UMSNH

Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro CIAD

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada CIAD

Dr. Guillermo Fuentes Dávila INIFAP

Dr. Ángel Rebollar Alviter Universidad Autónoma Chapingo

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dra. Lilian Amorim, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Rodrigo Valverde Louisiana State University, USA

Dr. Sami Jorge Michereff Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Dr. Pedro W. Crous, Pretoia & Free State (SA) Universities, Holland.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, CIATEJ A.C.

Dra. Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados

Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Instituto Tecnológico Agropecuario Conkal

Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, UAEM

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN

Dr. Ángel Rebollar Alviter, Universidad Autónoma de Chapingo

Dr. J. Joel E. Corrales García, Universidad Autónoma de Chapingo

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia * Phenotypic Characterization of *Mycosphaerella fijiensis* and its Relation with Sensitivity to Fungicides in Colombia. 1
Leonardo Sepúlveda.

Identificación y alternativas de manejo de la cenicilla del rosal * Identification and management alternatives of powdery mildew in rosebush. 22
Domínguez-Serrano D, García-Velasco R, Mora-Herrera ME y Salgado-Siclan ML.

ARTÍCULO DE REVISIÓN * REVISION ARTICLES

Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios * Role of Lignin in the Plant- Sedentary Endoparasitic Nematodes Interaction. 43
Lagunes-Fortiz E y Zavaleta-Mejía E.

Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms? * Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana?. 64
Muñiz CH, Guerrero-Prieto VM, Parra-Quezada RA, Noriega-Orozco LO y Ávila-Quezada GD.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATOLOGICAL NOTES

Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi * Identificación y actividad antagonista in vitro de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. 85
Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM.

In vitro Toxicity of Tropical Mexican Micromycetes on Infective Juveniles of *Meloidogyne incognita* * Toxicidad in vitro de Micromicetos del Trópico Mexicano en Juveniles Infecciosos de *Meloidogyne incognita* 100
Gamboa-Angulo M, Moreno-Escobar JA, Herrera-Parra E, Pérez-Cruz J, Crsitobal-Alejo J y Heredia-Abarca G.

Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México * Etiology of wilt and basal rot of *Jatropha curcas* in Arriaga, Chiapas, Mexico. 110
Salazar-Pinacho WM, Quiroga-Madrigal RR, Rosales- Esquinca MA, Garrido-Ramírez ER y Holguín-Meléndez F.

Nemátodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* AA) en el centro de Veracruz, México * Plant parasitic nematodes associated to banana roots (*Musa acuminata* AA) in central Veracruz, México. 116
Lara-Posadas AV, Núñez-Sánchez AE, López-Lima D y Carrión G.

Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia

Phenotypic Characterization of *Mycosphaerella fijiensis* and its Relation with Sensitivity to Fungicides in Colombia

Leonardo Sepúlveda R. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Cra. 72 A No 78 B 141. Medellín, Colombia. Correspondencia: leoxepulveda@gmail.com; lsepulveda@cib.org.co

Recibido: 5 de Agosto, 2015

Aceptado: 18 de Noviembre, 2015

Sepúlveda L. 2015. Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 1-21.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507.8](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507.8)

Primera Publicación DOI: 30 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 30, 2015.

Resumen. El control de *Mycosphaerella fijiensis*, requiere cada vez la aplicación de una mayor cantidad de fungicidas debido a la resistencia que este patógeno ha desarrollado. Se realizó una caracterización fenotípica de aislamientos de *M. fijiensis* en relación a su sensibilidad a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf esperando complementar los métodos actuales de monitoreo de resistencia. A partir de tejido foliar sintomático recolectado desde 12 fincas bananeras de Colombia durante los años 2013 y 2014, se obtuvo aislamientos monospóricos a los que se les cuantificó la sensibilidad poblacional e individual. Posteriormente esta sensibilidad se comparó con los rasgos fenotípicos que cada aislamiento expresó. Los resultados indicaron que los rasgos asociados con una mayor sensibilidad a piraclostrobin se expresaron en un mayor número de individuos, además se observó la

Abstract. Controlling *Mycosphaerella fijiensis* increasingly requires the use of greater amounts of fungicides due to the resistance this pathogen has developed. A phenotypic characterization of *M. fijiensis* isolates in relation to their sensitivity to fungicides pyraclostrobin, epoxiconazole and tridemorph was carried out, with the intention of complementing existing methods of resistance monitoring. From symptomatic leaf tissue gathered from 12 banana farms in Colombia in 2013 and 2014, monosporic isolates were obtained and their population sensitivity and individual sensitivity were measured. This sensitivity was then compared with phenotypic traits expressed by each isolate. Results indicated that the traits associated with a greater sensitivity to pyraclostrobin were expressed in a greater number of individuals; in addition, the expression of these same features was observed as response to epoxiconazole. For tridemorph, an apparent shared domain was observed among individuals with traits associated to low and high sensitivities. A phenotypic characterization would help find if there are more or fewer individuals tolerant to an active ingredient and to define the time most suitable to apply this active ingredient

expresión de estos mismos rasgos como respuesta a epoxiconazol. Para tridemorf se observó un aparente dominio compartido entre individuos con rasgos asociados a baja y alta sensibilidad. Una caracterización fenotípica permitiría conocer si existe un mayor o menor número de individuos tolerantes a un ingrediente activo y poder definir de esta forma el momento adecuado para aplicar este ingrediente activo sin aumentar la presión de selección sobre estos individuos.

Palabras clave: Piraclostrobin, Epoxiconazol, Tridemorf. Presión de selección. Eficacia biológica.

INTRODUCCIÓN

En Colombia el banano es el tercer recurso agrícola de mayor exportación después del café y las flores, sin embargo estos niveles de exportación son afectados en gran medida por los problemas fitopatológicos (AUGURA, 2015). Entre los patógenos que afectan el banano, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra es considerada la enfermedad más importante y con mayor relevancia a nivel mundial (FRAC, 2014). Y debido a la susceptibilidad de este cultivo a la enfermedad se requiere el uso de múltiples fungicidas a frecuencias relativamente altas con costos estimados en más del 30 % del total de la producción (Churchill, 2011).

En Colombia así como en los demás países exportadores de banano donde se ha reportado a *M. fijiensis*, su control se ha vuelto cada vez más costoso tanto económica como ambientalmente debido a que el número de tratamientos químicos necesarios ha aumentado con el tiempo a causa de la rápida aparición de resistencia a los diferentes fungicidas que han sido empleados (Pérez-Vicente,

without increasing the selection pressure on these individuals

Additional key words: Pyraclostrobin, Epoxiconazole, Tridemorph. Selection pressure. Biological fitness.

INTRODUCTION

In Colombia, the banana tree is the most widely exported crop after coffee and flowers, yet these levels of export are largely affected by plant health problems (AUGURA, 2015). Amongst the pathogens that affect banana plantations, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the agent that causes black sigatoka, is considered the most important and relevant disease on a global scale (FRAC, 2014). Due to the vulnerability of this crop to the disease, multiple fungicides are required to be used at relatively high frequencies with costs estimated at more than 30 % of the total of the production (Churchill, 2011).

In Colombia, as in all the other banana-exporting countries in which *M. fijiensis* has been reported, its control has come at a great cost, both economically and environmentally, since the necessary number of treatments has increased with time, due to the fast appearance of resistance to the different fungicides that have been used (Pérez-Vicente, 2006; de Bellaire *et al.*, 2010; FRAC, 2014).

Despite the resistance to fungicides is one of the main limitations in the control of this disease, it is worth noting that resistance is a direct cause of the application of fungicides, and is therefore inevitable (Grimmer *et al.*, 2015). However, its intensity and impact on the final production costs can be controlled, and for this purpose, the most useful tool is considered to be a continuous monitoring of the evolution of the resistance, which helps

2006; de Bellaire *et al.*, 2010; FRAC, 2014).

A pesar que la resistencia a fungicidas es uno de los principales limitantes en el control de esta enfermedad se debe tener en cuenta que la resistencia es una causa directa de la misma aplicación de los fungicidas y por lo tanto inevitable (Grimmer *et al.*, 2015), sin embargo su intensidad e impacto sobre los costos finales de producción sí pueden ser controlados y para este fin se ha considerado que la herramienta más útil es implementar un monitoreo continuo de la evolución de la resistencia, que permita la identificación de los individuos resistentes a la acción de un fungicida, los que según su número determinarán si la resistencia se está afianzando dentro de la población (Van Den Bosch *et al.*, 2011).

En *M. fijiensis* el método de monitoreo más confiable para identificar la presencia de individuos resistentes consiste en la medición de la longitud del tubo germinativo de esporas que germinan en presencia del fungicida (FRAC, 2008). No obstante en una población de *M. fijiensis* se pueden encontrar diferentes niveles de inhibición de los tubos germinativos a una concentración del fungicida, por lo que algunos individuos resistentes pueden pasar desapercibidos (Pérez-Vicente, 2006).

Con esta investigación se busco complementar los métodos actuales para monitorear la resistencia a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, al aumentar las variables fenotípicas que pueden ser relacionadas con el nivel de sensibilidad, lo que daría mayor certeza al identificar los individuos resistentes y de esta forma poder definir con anterioridad a la aplicación de uno de estos ingredientes activos si la población patógena se encuentra conformada por un mayor o menor número de individuos tolerantes a estos ingredientes activos y así evitar una mayor presión de selección sobre estos individuos.

identify the individuals resistant to the action of a fungicide, which, depending on their number, will determine if the resistance is being consolidated in the population (Van Den Bosch *et al.*, 2011).

In *M. fijiensis*, the most reliable monitoring method to help identify the presence of resistant individuals consists of measuring the length of the germ tube of spores that germinate in the presence of the fungicide (FRAC, 2008). Nevertheless, in a population of *M. fijiensis*, different levels of inhibition of the germ tubes can be found for one concentration of the fungicide, and therefore some resistant individuals could go unnoticed (Pérez-Vicente, 2006).

The aim of this investigation was to compliment current methods for monitoring the resistance to the fungicides piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf, by increasing the phenotypical variables that could be related to levels of sensitivity, which would give a greater degree of certainty by identifying the resistant individuals, thus defining the application of one of these active ingredients beforehand if the pathogenic population is composed of a greater or lower number of individuals tolerant to those active ingredients, therefore avoiding a greater selection pressure on these individuals.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The experimental design was carried out taking the following into consideration:

- 1) Each *finca*, or property, was taken as an independent pathogenic population, the individuals of which were represented by the multiple spores or individuals produced in the infectious cycle of the disease.
- 2) If the phenotype is considered the expression of the genotype based on a given

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El diseño experimental se realizó a partir de las siguientes consideraciones:

1) Cada finca se tomó como una población patógena independiente cuyos individuos estuvieron representados por las múltiples esporas o individuos producidos en el ciclo infeccioso de la enfermedad. 2) Si se considera al fenotipo como la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente y que en el ambiente de *M. fijiensis* la presión ejercida por los fungicidas favorece los genotipos que permiten tolerar en mayor medida la acción de estos fungicidas, se esperaría por lo tanto que si hay un genotipo favorecido este se expresaría a través de rasgos fenotípicos identificables entre individuos. 3) Por evaluaciones previas se ha observado que diferentes rasgos fenotípicos se repiten entre individuos, indicando que probablemente exista una relación entre estos rasgos. 4) Los ingredientes activos evaluados han sido aplicados comercialmente en campo, por lo que la población y los individuos patógenos de este estudio ya han sido sometidos a la presión de selección de estos fungicidas. En base a estas consideraciones se diseñaron experimentos *in vitro* dirigidos a comparar si la sensibilidad poblacional (finca) o la sensibilidad individual (monospóric) hacia piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, tiene relación con el comportamiento fenotípico de cada individuo.

VARIABLES fenotípicas evaluadas

Se realizó una caracterización fenotípica que permitió dividir los aislamientos en dos grupos, uno conformado por dos variables cuantitativas y el otro conformado por seis variables cualitativas (Figura 1). El primer grupo estuvo conformado por

environment, and that in *M. fijiensis*' environment, the pressure exerted by the fungicides favors the genotypes that help tolerate, to a greater or lesser degree, the action of these fungicides, it would be therefore expected that if there is a favored genotype, it would express itself through phenotypical traits, identifiable among individuals. 3) Previous evaluations have shown that different phenotypical traits repeat themselves between individuals, indicating a probable relationship between these traits. 4) The active ingredients evaluated have been used commercially on the field, therefore the population and the pathogenic individuals of this study have already undergone the selection pressure of these fungicides. Based on these conditions, *in vitro* experiments were designed to compare if the population sensitivity (property) or the individual sensitivity (monosporic) to piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf, is related to the phenotypic behavior of each individual.

Phenotypic Variables Evaluated

A phenotypic characterization was performed which helped divide the isolates into two groups, one made up of quantitative variables, and the other, by six qualitative variables (Figure 1). The first group was composed of the phenotypic data, qualified quantitatively: length of the germ tube and biomass production (weight of the mycelium); the second group was composed of qualitative variables: 1) number of germ tubes (one germ tube only, two germ tubes of similar lengths or two unequal germ tubes in which one is less than half as long as the other. 2) Branching of the germ tube (germ tubes, branched or not branched. 3) Color of the mycelium (white, pink, or gray), 4) Morphology of the mycelium (circular division on the mycelium, parallel division on the mycelium, irregular division and indefinite division, 5)

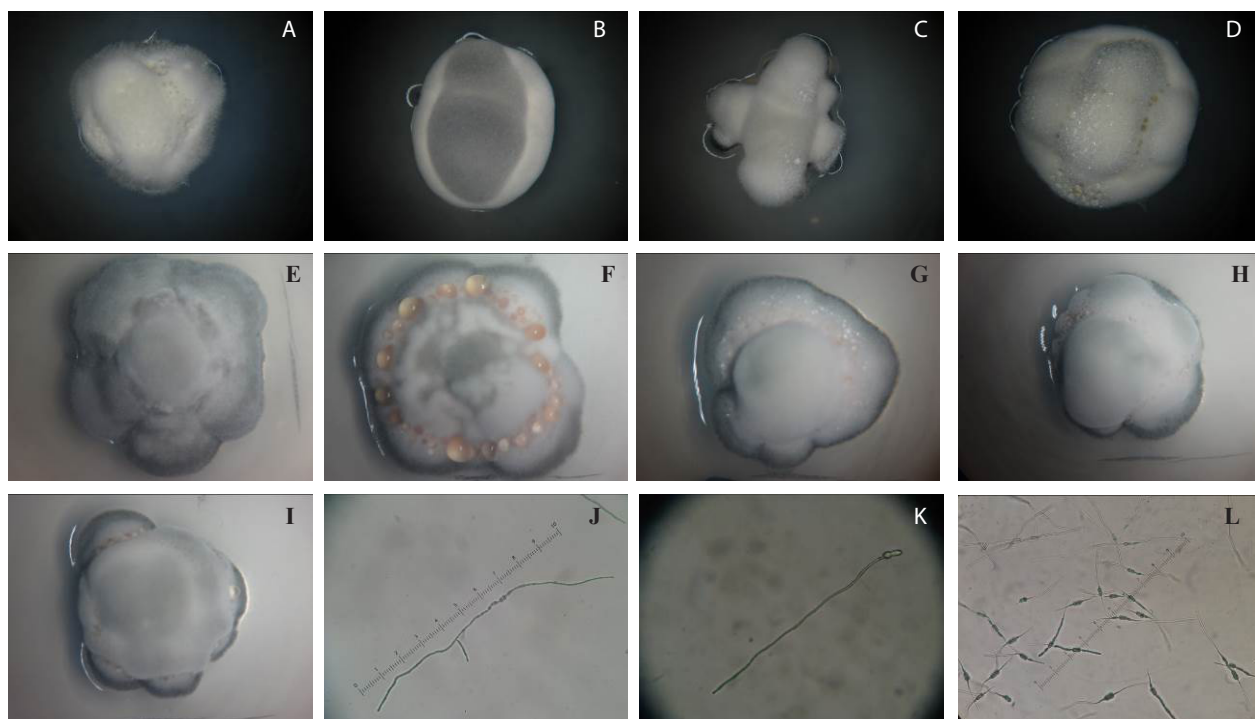


Figura 1. Variables fenotípicas cualitativas. De izquierda a derecha: A) Color blanco, morfología indefinida, con exudado, forma amorfa. B) color gris, morfología paralela, sin exudado, forma ovoide. C) color blanco, morfología indefinida, sin exudado, forma amorfa. D) color blanco, morfología paralela, con exudado, forma ovoide. E) color gris, morfología circular, sin exudado, forma ovoide. F) color rosa, morfología irregular, con exudado, forma ovoide. G) color rosa, morfología circular, con exudado, forma ovoide. H) color rosa, morfología paralela, con exudado, forma ovoide. I) color gris, morfología indefinida, con exudado, forma ovoide. J) dos tubos germinativos de similar longitud, con ramificaciones. K) un solo tubo germinativo, sin ramificaciones. L) dos tubos germinativos de similar longitud y en el que uno mide menos de la mitad del otro, sin ramificaciones.

Figure 1. Qualitative phenotypic variables. From left to right: A) White, undefined morphology, with exudate, amorphous shape. B) Gray, parallel morphology, no exudate, oval-shaped. C) white, undefined morphology, no exudate, amorphous shape. D) white, parallel morphology, with exudate, oval-shaped. E) gray, circular morphology, no exudate, oval-shaped. F) pink, irregular morphology, with exudate, oval-shaped. G) pink, circular morphology, with exudate, oval-shaped. H) pink, parallel morphology, with exudate, oval-shaped. I) gray, undefined morphology, with exudate, oval-shaped. J) two germ tubes of similar length with ramifications. K) one germ tube, without ramifications. L) two germ tubes of similar length where one is less than half the length of the other, without ramifications.

los rasgos fenotípicos calificados cuantitativamente: Longitud del tubo germinativo y Producción de biomasa (peso del micelio); el segundo grupo estuvo constituido por variables cualitativas: 1) Número de tubos germinativos (Un solo tubo germinativo, dos tubos germinativos de similar longitud o dos tubos germinativos desiguales en el cual uno mide menos de la mitad del otro. 2) Ramificación

Presence of exudate (exudate present or absent, 6) Shape of the mycelium (ovoidal or undefined “amorphous”).

Plant Material

Plant samples were used with symptoms of being in stage six of the disease (final stage of the disease, characterized by sexual recombination and

del tubo germinativo (Tubos germinativos con ramificaciones o sin ramificaciones, 3) Color del micelio (Color blanco, rosa o gris), 4) Morfología del micelio (división circular sobre el micelio, división paralela sobre el micelio, división de forma irregular y división de forma indefinida, 5) Presencia de exudado (exudado presente o ausente, 6) Forma del micelio (ovoide o indeterminada “amorfa”).

Material vegetal

Se emplearon muestras vegetales con síntomas en estadio seis de la enfermedad (estadio final de la enfermedad caracterizado por la recombinación sexual y la producción de esporas), obtenidas durante los años 2013 y 2014, desde 12 fincas bananeras de Colombia, siete ubicadas en la región de Urabá y seis en la región de Santa Marta. De las 12 fincas, 10 fueron fincas comerciales y por lo tanto la población patógena allí ubicada ha sido constantemente sometida a la presión de los fungicidas y se espera que en mayor o menor medida hayan generado pérdida de sensibilidad, mientras las dos fincas restantes (nombradas como finca silvestre) no son fincas comerciales, por lo que la población patógena que allí se encuentra no ha sido sometida a la presión de los fungicidas y presenta altos niveles de sensibilidad hacia los diferentes ingredientes activos.

Determinación de la sensibilidad poblacional de *M. fijiensis* a los fungicidas

Inicialmente se cuantificó la sensibilidad en cada finca a partir del protocolo avalado por FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) (FRAC, 2008) para la evaluación de fungicidas sistémicos en *M. fijiensis*, denominado como “*Ascospore germ tube elongation*” basado en la medición de la longitud del tubo germinativo que permite valorar el nivel de sensibilidad poblacional a partir del promedio de mediciones individuales. Las concentraciones

the production of spores), obtained during 2013 and 2014, from 12 banana-producing properties in Colombia, seven of which are found in the Urabá region, and six in the Santa Marta region. Out of the 12 properties, 10 were commercial properties, and therefore the pathogenic population found there has been constantly placed under the pressure of fungicides, and they are expected to have lost, to a greater or lesser degree, their sensitivity, whereas in the two remaining properties (named as wild *fincas*) are not commercial properties, so the pathogenic populations found there have not undergone the pressure of fungicides and show high levels of sensitivity towards the different active ingredients.

Determining the Sensitivity of *M. fijiensis* Populations to Fungicides

Initially, the sensitivity was measured in each property using the protocol endorsed by FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) (FRAC, 2008) for the evaluation of systemic fungicides in *M. fijiensis*, called “*Ascospore germ tube elongation*,” based on the measurement of the length of the germ tube, which helps value the level of population sensitivity from the average of individual measurements. Both the concentrations and the number of individuals or spores measured were fixed according to FRAC specifications. For fungicides QoI to which piraclostrobin belongs, three concentrations were evaluated for every property (0 - 1 - 10 mg/L) and 600 spores were measured for each property. For the two remaining active ingredients, the specifications given for SBI (*Sterol Biosynthesis Inhibitors*)-type synthesis were taken, to which both epoxiconazol and tridemorf belong. In this way, for epoxiconazol, for every *finca* 210 spores were evaluated in five concentrations (0 - 0.01 - 0.03 - 0.1 and 1 mg/L). For tridemorf, six concentrations were evaluated (0

así como el número de individuos o esporas medidas se fijaron según las especificaciones FRAC. Para fungicidas QoI al que pertenece piraclostrobin se evaluaron por finca tres concentraciones (0-1-10 mg/L) y se midió un número de 600 esporas por finca. Para los dos ingredientes activos restantes se tomaron las especificaciones dadas para fungicidas tipo SBI's (*Sterol Biosynthesis Inhibitors*) al que pertenecen tanto epoxiconazol como tridemorf. De esta forma para el epoxiconazol se evaluaron por finca 210 esporas en cinco concentraciones (0 - 0.01 - 0.03 - 0.1 y 1 mg/L). Mientras para el tridemorf se evaluaron seis concentraciones (0 - 0.1-0.3 - 1 - 3 y 10 mg/L) y un número de 240 esporas por finca.

Aislamiento monospóricos

Luego de establecer la sensibilidad poblacional y a partir de este mismo montaje se seleccionaron al azar esporas germinadas en ausencia del fungicida (0 mg/L), a las que previamente se les cuantificó la longitud, la existencia de ramificaciones y el número de tubos germinativos. Estas esporas fueron aisladas por medio de un microscopio de luz y un capilar de vidrio y llevadas a medio nutritivo PDA donde crecieron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por un periodo de 40 días hasta obtener un cultivo monospórico. Transcurrido este tiempo se determinó el color, la morfología, la presencia de exudado y la forma del micelio, luego y aprovechando el crecimiento compacto no extendido de *M. fijiensis* bajo condiciones *in vitro*, el total de micelio fue pesado en balanza analítica y se pudo cuantificar la biomasa producida. Se obtuvo un total de 123 cultivos monospóricos sobre los que se realizaron las comparaciones.

Determinación de la sensibilidad individual de *M. fijiensis* a los fungicidas

A partir de los 123 cultivos monospóricos, se

- 0.1 - 0.3 - 1 - 3 and 10 mg/L) and 240 spores for every *finca*.

Monosporic Isolates

After establishing population sensitivity and from this setup, germinated spores were selected at random in the absence of the fungicide (0 mg/L), which were previously quantified for length, the existence of ramifications, and number of germ tubes. These spores were isolated using a light microscope and a glass capillary tube, and transferred to a PDA nutritional medium where they grew at room temperature (26 ± 1 °C) for 40 days until a monospore culture was obtained. After this time, the color, morphology, the presence of an exudate, and the shape of the mycelia were determined. Next, and taking advantage of the compact and non-extended growth of *M. fijiensis* under *in vitro* conditions, the total mycelia were weighed using an analytic scale, and the biomass produced was quantified. A total of 123 monospore cultures was obtained, and comparisons were carried out on these.

Determining the Individual Sensitivity of *M. fijiensis* to Fungicides

Out of the 123 monospore cultures, those with the greatest differences in the length of the germ tube and weight of the mycelia were chosen (since the sensibility measurements were based on these traits) and a total of 41 monospore isolates was obtained; their individual sensitivity to the three active ingredients was quantified using spectrophotometric microtechnics (Table 1). This technique is also endorsed by FRAC, but not for *M. fijiensis*, since the absence of sexual sporulation of this pathogen *in vitro* implies that this evaluation must be performed on monospore cultures or on a limited number of individuals that would not represent the population. In this way, this technique

seleccionaron los de mayores diferencias en la longitud del tubo germinativo y en el peso del micelio (debido a que sobre estos rasgos se basó la cuantificación de sensibilidad) y se obtuvo un total de 41 aislamientos monospóricos a los que se les cuantificó la sensibilidad individual a los tres ingredientes activos empleando microtécnica espectrofotométrica (Cuadro 1). Esta técnica es también avalada por FRAC pero no para *M. fijiensis*, debido a que la ausencia de esporulación sexual de este patógeno bajo condiciones *in vitro* implica que esta evaluación deba realizarse sobre cultivos monospóricos o sobre un limitado número de individuos que no representarían la población, de esta forma esta técnica no sería útil para la determinación de la sensibilidad de una población pero sí para determinar la sensibilidad de un individuo de esa población. Esta técnica se basó en preparar a partir del micelio de cada uno de los 41 aislamientos monospóricos, una suspensión a una concentración de 10^4 fragmentos de micelio/ml, que fue puesta en incubación durante ocho días en platos ELISA de 96 pozos. Para cada ingrediente activo se evaluaron cuatro concentraciones: piraclostrobin (0 - 0.1 - 1 - 20 mg/L); epoxiconazol (0 - 0.1 - 1 y 10 mg/L) y tridemorf (0 - 1 - 10 y 100 mg/L). Estas concentraciones se fijaron a partir de evaluaciones previas en las que se estableció el rango de inhibición para cada uno de los ingredientes activos cuando se empleó esta técnica.

Cuantificación de la sensibilidad

El parámetro empleado para cuantificar la sensibilidad tanto a nivel poblacional como individual fue la IC_{50} “*half maximal inhibitory concentration*”, calculada a partir de la regresión lineal de dos puntos ($Y = mX + b$), donde los puntos graficados fueron las concentraciones por encima y por debajo entre las que se encontraría el 50 % de inhibición y la curva resultante para cada fungicida se represen-

would not be useful for determining the sensitivity of a population, but it would be to determine the sensitivity of an individual from that population. This technique was based on the preparation, based on the mycelia of each one of the 41 monospore isolates, a suspension at a concentration of 10^4 mycelium fragments/ml, which was incubated for eight days in eight ELISA dishes with 96 pits. For each active ingredient, four concentrations were evaluated: piraclostrobin (0 - 0.1 - 1 - 20 mg/L); epoxiconazol (0 - 0.1 - 1 and 10 mg/L) and tridemorf (0 - 1 - 10 y 100 mg/L). These concentrations were fixed from previous evaluations in which the inhibition range was established for each active ingredient when this technique was used.

Quantification of Sensitivity

The parameter used to quantify the sensitivity, both at a population and an individual level, was the IC_{50} “*half maximal inhibitory concentration*”, calculated from a linear regression of two points ($Y = mX + b$), where the points graphed were the concentrations above and below, between which would lie 50 % of inhibition and the resulting curve for each fungicide was represented in an Excel spreadsheet, along with the IC_{50} estimated. The estimated IC_{50} was the dose or concentration (X axis) produced by 50 % inhibition (Y axis) in the curve (Chinn, 1997).

Statistical Analysis

In order to establish if there were significant differences between the expression of the different phenotypical features, as well as between the expression of these ranges with individual or population sensitivity to the fungicides evaluated, variance analyses were carried out with 95 % confidence to compare between the factors that represent the quantitative variables: a) Length of the germ tube, b) Production of biomass, c) Population

Cuadro 1. Rasgos fenotípicos para los 41 aislamientos monospóricos (31 provenientes de fincas comerciales y 10 provenientes de fincas silvestres) a los que se les midió la sensibilidad tanto por medición del tubo germinativo como por microtécnica. (A) Aislamiento. (T) Número de tubos germinativos. (R) Ramificación. (C) Color (bl: blanco. ro: rosa. gr: gris). (M) Morfología (ci: circular. pa: paralela. in: indefinida. irr: irregular). (E) Exudado (au: ausente. pr: presente). (F) Forma (am: amorfa. ov: ovoide). (um) Longitud tubo germinativo. (mg) Peso biomasa. (P.t) IC₅₀ piraclostrobin tubo germinativo. (E.t) IC₅₀ epoxiconazol tubo germinativo. (T.t) IC₅₀ tridemorf tubo germinativo. (P.m) IC₅₀ piraclostrobin microtécnica. (E.m) IC₅₀ epoxiconazol microtécnica. (T.m) IC₅₀ tridemorf microtécnica.

Table 1. Phenotypic traits for the 41 monospore isolates (31 from commercial properties and 10 from wild properties) which were measured for sensitivity via measurement of the germ tube and microtechnics. (A) Isolation. (T) Number of germ tubes. (R) Ramification. (C) Color (bl:white. ro: pink. gr: gray). (M) Morphology (ci: circular. pa: parallel. in: undefined. irr: irregular). (E) Exudate (au: absent. pr: present). (F) Shape(am: amorphous. ov: oval). (um) Length germ tube. (mg) Bio-mass weight. (P.t) IC₅₀ piraclostrobin germ tube. (E.t) IC₅₀ epoxiconazol germ tube. (T.t) IC₅₀ tridemorf germ tube. (P.m) IC₅₀ piraclostrobin microtechnics. (E.m) IC₅₀ epoxiconazol microtechnics. (T.m) IC₅₀ tridemorf microtechnics.

Aislamientos Monospóricos, Rasgos Fenotípicos y Sensibilidad														
A	T	R	C	M	E	F	um	mg	P.t	E.t	T.t	P.m	E.m	T.m
C1	uno	no	bl	ci	au	am	187	207	0,87	0,17	1,56	5,4	1,3	9,3
C2	dos	no	gr	in	pr	am	96	122	0,87	0,17	1,56	11,3	0,7	17,3
C3	uno	si	gr	pa	au	ov	172	70	0,87	0,17	1,56	7,0	2,4	25,8
C4	uno	no	gr	in	au	am	213	135	0,87	0,17	1,56	7,0	1,0	28,4
C5	mitad	si	bl	pa	au	ov	182	297	0,88	0,28	1,70	14,0	0,9	58,8
C6	dos	no	gr	irr	pr	am	76	135	0,88	0,28	1,70	8,5	0,9	23,6
C7	mitad	si	gr	ci	au	am	177	68,6	0,88	0,28	1,70	15,7	3,7	53,5
C8	mitad	si	gr	in	au	ov	288	114	0,88	0,28	1,70	14,3	0,8	16,1
C9	mitad	no	gr	ci	pr	am	127	74,2	0,62	0,30	1,46	14,4	0,5	46,9
C10	dos	si	bl	in	au	am	101	279	0,62	0,30	1,46	6,6	0,6	17,2
C11	dos	si	ro	pa	pr	ov	202	197	0,62	0,30	1,46	8,3	3,6	9,1
C12	dos	no	gr	ci	au	ov	116	141	0,60	0,21	0,72	7,8	0,9	9,1
C13	mitad	si	bl	irr	au	am	283	244	0,60	0,21	0,72	9,0	0,6	8,1
C14	mitad	no	gr	irr	au	ov	202	92,5	0,60	0,21	0,72	17,4	0,7	9,6
C15	mitad	no	gr	in	pr	ov	152	119	0,64	0,09	0,29	0,1	0,6	7,8
C16	mitad	si	ro	irr	pr	ov	86	278	0,64	0,09	0,29	0,1	1,0	8,1
C17	dos	no	gr	irr	pr	ov	71	127	0,58	0,08	0,62	7,3	7,3	6,4
C18	dos	si	gr	in	pr	ov	91	112	0,58	0,08	0,62	15,2	0,6	84,0
C19	mitad	no	ro	pa	pr	ov	157	245	0,58	0,08	0,62	0,1	0,9	61,9
C20	mitad	si	bl	pa	pr	ov	334	220	0,88	0,32	2,41	11,2	0,9	22,9
C21	mitad	si	ro	pa	pr	ov	152	257	0,88	0,32	2,41	11,4	4,7	67,9
C22	dos	si	ro	pa	pr	ov	96	179	0,88	0,32	2,41	9,8	3,8	59,5
C23	mitad	no	gr	in	au	ov	127	161	0,69	0,08	1,53	4,7	0,6	50,5
C24	mitad	si	ro	in	pr	ov	207	309	0,69	0,08	1,53	0,4	4,0	7,4
C25	dos	no	gr	pa	au	ov	111	131	0,71	0,37	2,43	0,1	0,9	29,8
C26	mitad	si	bl	irr	pr	ov	390	217	0,71	0,37	2,43	13,9	6,3	62,2
C27	dos	no	gr	in	au	ov	162	72,6	0,71	0,37	2,43	15,6	0,9	55,7
C28	uno	si	gr	pa	pr	am	334	199	0,78	0,17	1,62	13,6	1,5	59,7
C29	mitad	si	gr	irr	pr	am	177	106	0,78	0,17	1,62	8,8	0,9	62,9
C30	dos	si	ro	pa	au	ov	132	263	0,78	0,17	1,62	11,5	0,7	9,3
C31	dos	si	bl	in	au	ov	96	110	0,78	0,17	1,62	13,3	6,8	4,0
S1	mitad	no	bl	pa	pr	ov	258	140	0,52	0,01	1,99	0,1	0,0	0,8
S2	dos	si	bl	in	pr	ov	56	93,6	0,52	0,01	1,99	0,1	0,0	0,9
S3	mitad	no	gr	in	pr	ov	187	99,1	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	8,0
S4	dos	no	ro	pa	pr	ov	213	273	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	11,0
S5	dos	si	gr	irr	pr	am	182	261	0,50	0,01	1,56	0,1	0,0	0,7
S6	dos	si	ro	in	au	ov	142	399	0,50	0,01	1,56	0,1	0,0	2,3
S7	dos	si	gr	ci	au	ov	142	50,8	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	89,0
S8	dos	si	gr	pa	pr	ov	278	212	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	60,5
S9	dos	no	gr	pa	pr	ov	197	221	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	18,3
S10	dos	si	gr	pa	au	am	15	140	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	69,3

Fincas Comerciales

Fincas Silvestre

tó en un gráfico de Excel junto con la IC_{50} estimada. La IC_{50} estimada fue la dosis o concentración (eje X) que produjo el 50 % de inhibición (eje Y) en la curva (Chinn, 1997).

Análisis estadístico

Para establecer si existieron diferencias significativas entre la expresión de los diferentes rasgos fenotípicos, además entre la expresión de estos rasgos con la sensibilidad individual o poblacional a los fungicidas evaluados, se realizaron análisis de varianza con un 95 % de confianza para comparar entre los factores que representan las variables cuantitativas: a) Longitud del tubo germinativo, b) Producción de biomasa, c) Sensibilidad poblacional o individual a cada ingrediente activo (IC_{50}). Y los factores que representan las variables cualitativas: a) Número de tubos germinativos, b) Ramificación del tubo germinativo, c) Coloración del micelio, d) Morfología del micelio, e) Presencia de exudado, f) Forma del micelio. Aceptando la significancia estadística siempre que el P-valor fuera menor que 0.05 (Cuadro 2). Se realizaron además pruebas de comparaciones múltiples dentro de los factores empleando el método de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para definir si existieron diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada variable cuantitativa cuando se comparó con la presencia de cada rasgo que representa las variables cualitativas (Cuadro 3).

Ingredientes activos

Los ingredientes activos evaluados, piraclostrobin; epoxiconazol y tridemorf, fueron tomados desde productos pertenecientes a la empresa BASF Química S.A. y empleados en la industria bananera bajo los nombres comerciales de COMET (Piraclostrobin 250 g/L); OPUS (Epoxiconazol 75 g/L) y CALIXIN (Tridemorf 750 g/L).

or individual sensitivity to each active ingredient (IC_{50}). And the factors that represent the qualitative variables: a) Number of germ tubes, b) Branching of germ tube, c) Color of mycelium, d) Morphology of the mycelium, e) Presence of exudate, f) Shape of mycelium. Accepting the statistical significance as long as the P-value is less than 0.05 (Table 2). Likewise, multiple comparison tests within the factors were carried out using Fisher's minimum significant difference method (LSD) to define if there were significant differences between the averages obtained for each quantitative variable when compared to the presence of each trait that the qualitative variables represent (Table 3).

Active Ingredients

The active ingredients evaluated (piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf), were taken from products belonging to the company BASF Química S.A. and used in the banana industry under the commercial names of COMET (Piraclostrobin 250 g/L), OPUS (Epoxiconazol 75 g/L), CALIXIN (Tridemorf 750 g/L).

RESULTS

Phenotypic Traits related to the Length of the Germ Tube

The variance analysis showed differences between factors for the number of germ tubes (Table 2y). In this way, within factors, when comparing averages, it was observed that spores that generated two germ tubes, but in which one reached less than half of the other's length, displayed a significant relation with germ tubes of greater length ($X=216$ um). However, when two tubes were presented with similar sizes, they related to a shorter length ($X=150$ um). Spores that only generated one germ tube were related to intermediate lengths

Cuadro 2. P-valor obtenidos a partir de análisis de varianza que comparó entre variables las cuantitativas (T.g: longitud tubo germinativo; P.b: producción biomasa; In: sensibilidad individual hacia el fungicida; Po: sensibilidad poblacional hacia el fungicida) y las variables cualitativas (y). Y cuando se comparó solo entre las variables cuantitativas (z). Desde que el P-valor fuera inferior a 0,05, existió significancia estadística.

Tabla 2. P-value obtained from the variance analysis that compared quantitative variables (T.g: length germ tube; P.b: biomass production; In: individual sensitivity to fungicide; Po: population sensitivity to fungicide) and qualitative variables (y). And when comparing only between quantitative variables (z). From the moment the P-value was lower than 0,05 was there a statistical significance.

Significancia Estadística entre Factores (P-valor)								
(y)								
Factores	T.g	P.b	Piraclostrobin		Epoxiconazol		Tridemorf	
			In	Po	In	Po	In	Po
Tubo germinativo	0,0001	0,54	0,59	0,026	0,542	0,630	0,485	0,116
Ramificación	0,0006	0,73	0,30	0,135	0,318	0,579	0,025	0,578
Color	0,0407	0,00	0,70	0,467	0,602	0,688	0,043	0,702
Morfología	0,6637	0,28	0,98	0,467	0,386	0,432	0,142	0,586
Exudado	0,5818	0,82	0,38	0,013	0,532	0,063	0,755	0,277
Forma	0,6954	0,13	0,78	0,040	0,134	0,567	0,769	0,255
(z)								
Fungicida	T.g		P.b	P.b vs T.g				
	In	Po	In					
Piraclostrobin	0,33	0,66	0,83	0,68				
Epoxiconazol	0,43	0,41	0,70					
Tridemorf	0,78	0,45	0,38					

RESULTADOS

Rasgos fenotípicos asociados a la longitud del tubo germinativo

El análisis de varianza mostró diferencias entre factores para el número de tubos germinativos (Cuadro 2y). Es así como dentro de los factores al comparar las medias se observó que las esporas que generaron dos tubos germinativos, pero en el que uno de ellos alcanzó menos de la mitad del otro, presentaron una relación significativa con tubos germinativos de mayor longitud (X=216 um). Sin embargo cuando se presentaron también dos tubos pero ambos tuvieron tamaños similares se relacionaron con una menor longitud (X=150 um). Espo-

and showed no significant differences with those spores with two germ tubes (X=185 um). The individuals that presented two similar-sized germ tubes, and therefore the shortest length, were the majority of the population, and represented 55 % of it, whereas those with greater lengths represented 34 % of the population (Table 3u). The existence of ramifications was another factor that presented significant differences between factors in relation to the length of the germ tube (Table 2y). Within the factors, and when comparing the averages, the appearance of these ramifications was significantly more related to longer germ tubes (X=208 um) than to shorter tubes (X=159 um). Individuals that presented ramifications and a greater length were the majority of the population, and accounted for 59 % (Table 3u). Germ tube length also displayed

Cuadro 3. Se muestra los rasgos evaluados, el número de individuos con ese rasgo, su porcentaje poblacional, la media estadística de la longitud del tubo germinativo en micrómetros (u), la media estadística del peso de la biomasa en miligramos (v), la media estadística de las IC₅₀ para los rasgos fenotípicos asociados a la sensibilidad poblacional a piraclostrobin (w), epoxiconazol (x), tridemorf (z), y la sensibilidad individual al tridemorf (y). (*) Indica diferencia significativa al comparar factores.

Table 3. The traits evaluated are shown, along with the number of individuals with each feature, its population percentage, the statistical average of the germ tube length in micrometers (u), the statistical average of the weight of the biomass in milligrams (v), the statistical average of the IC₅₀ for the phenotypical traits related to the sensitivity of the population to piraclostrobin (w), epoxiconazol (x), tridemorf (z), and the individual sensitivity to tridemorf (y). (*) indicates significant difference when comparing factors.

Comparaciones Múltiples Dentro de Factores														
Producción de Biomasa (v)				Tubo Germinativo (u)										
Color	#	%	Mean	Tubos	#	%	Mean	Color	#	%	Mean			
Gris	65	53	138,6	Dos	67	55	150	Rosa	28	23	160			
Blanco	30	24	172,8	Uno	14	11	185	Gris	65	53	180			
Rosa	28	23	210,2	Mitad	42	34	216	Blanco	30	24	210			
Blanco-Gris		* 34,1659		Dos-Mitad		* -12,8568		Blanco-Rosa		* 9,83423				
Blanco-Rosa		* -37,4329												
Gris-Rosa		* -71,5988												
						#	%	Mean	Individual Tridemorf (y)					
				No		50	41	159						
				Si		73	59	208	Irregular	8	19	8,17		
Poblacional Piraclostrobin (w)				No - Si		* -9,69532		Indefinida		13	32	14,8		
Tubos		#	%	Mean					Circular		5	12	31,9	
Dos	67	55	0,697					Paralela		15	37	32,1		
Mitad	42	34	0,697	Poblacional Epoxiconazol (x)				Irregular-Paralela		* -23,94				
Uno	14	11	0,805	Exudado		#	%	Mean						
Dos-Uno		* -0,108017		Presente		73	59	0,18						
Mitad-Uno		* -0,107801		Ausente		50	41	0,23	Color		#	%	Mean	
				Ausente-Presente		* 0,0491		Blanca		9	22	13		
Exudado		#	%	Mean					Rosa		9	22	14,8	
				Poblacional Tridemorf (z)				Gris		23	56	37,5		
Presente		73	59	0,699	Morfología		#	%	Mean	Blanca-Gris		* -24,551		
Ausente		50	41	0,767	Circular		23	19	1,54	Gris-Rosa		* 22,778		
Ausente-Presente		*0,06662		Irregular		27	22	1,59						
				Indefinida		31	25	1,76	Ramificación		#	%	Mean	
Forma		#	%	Mean	Paralela		42	34	1,87	No		17	41	11,5
Ovoide	88	72	0,703	Circular - Paralela		* -0,3285		Si		24	59	32		
Amorfa	35	28	0,763	Irregular - Paralela		* -0,2783		No - Si		* -20,4421				
Amorfa-Ovoide		* 0,06023												

ras que solo generaron un tubo germinativo se relacionaron a longitudes intermedias y no presentaron diferencias significativas con aquellas esporas de dos tubos germinativos (X=185 um). Los individuos que presentaron dos tubos germinativos de tamaño similar y por lo tanto la menor longitud fueron mayoría dentro de la población y representaron

significant differences between factors with the mycelium color (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of averages, it was observed that a greater length gave rise to a white mycelium (X=210 um), while a shorter length generated pink mycelia (X=160 um). No significant differences were observed when the mycelium obtained was

el 55 % de esta, mientras los de mayor longitud representaron un 34 % de la población (Cuadro 3u). La existencia de ramificaciones fue otro factor que presentó diferencias significativas entre factores en relación a la longitud del tubo germinativo (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias la aparición de estas ramificaciones estuvo significativamente relacionada a tubos germinativos de mayor longitud ($X=208$ μm) que a de menor longitud ($X=159$ μm). Los individuos que presentaron ramificaciones y una mayor elongación fueron mayoría dentro de la población y representaron el 59 % (Cuadro 3u). La longitud del tubo germinativo también presentó diferencias significativas entre los factores con el color del micelio (Cuadro 2y), dentro de los factores y al comparar las medias se observó que una mayor longitud dio lugar a micelio color blanco ($X=210$ μm), mientras una menor longitud generó micelio color rosa ($X=160$ μm). No existieron diferencias significativas cuando se obtuvo micelio color gris ($X=180$ μm). El micelio de color gris relacionado con esporas de tubo germinativo de tamaño intermedio fue mayoría dentro de la población y representó el 53 %. Mientras el micelio de color blanco relacionado a una mayor longitud representó un 24 % de la población, porcentaje similar al 23 % del micelio color rosa relacionado a una menor longitud (Cuadro 3u).

Rasgos fenotípicos asociados a la producción de biomasa

Existieron diferencias significativas entre los factores para la cantidad de biomasa producida por cada individuo y el color del micelio (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias los individuos de menor peso correspondieron a los de color gris ($X=139$ mg), los de color blanco se relacionaron a un peso mayor que el gris ($X=173$ mg) pero menor que el rosa ($X=210$ mg), que fue el color asociado a una mayor producción de biomasa.

gray ($X=180$ μm). The gray mycelia related to medium-sized germ tube spores were the majority in the population, with 53 %. Meanwhile, the white mycelia related to a greater length accounted for 24 % of the population, a similar percentage to the 23 % of the pink mycelia related to a shorter length (Table 3u).

Phenotypic Traits Related to Biomass Production

There were significant differences between factors for the amount of biomass produced by each individual and the color of the mycelia (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of the averages, individuals that weighed less corresponded to those colored gray ($X=139$ mg), white ones were related to a heavier weight than gray ($X=173$ mg), although lighter than pink ($X=210$ mg), which was the color related to a greater production of biomass. Proportional distribution indicated that 53 % of all individuals showed gray mycelia, and therefore lower weight, while 24 % presented white mycelia, and the remaining 23 % displayed pink mycelia and a higher weight (Table 3v).

Phenotypic Traits Related to Sensitivity to Fungicides

The level of sensibility to the evaluated fungicides was established using an IC_{50} found by spectrophotometric microtechnics from monospore crops that helped find a response for individuals, as well as an IC_{50} found from the average of the lengths reached by the germ tubes of a particular number of spores that helped find a response for the population.

Piraclostrobin

Individual Response. Among the factors, no significant differences were found between the

La distribución proporcional indicó que un 53 % de los individuos presentaron micelio color gris y por lo tanto un menor peso, mientras un 24 % presentó micelio color blanco y el 23 % restante presentó micelio color rosa y un mayor peso (Cuadro 3v).

Rasgos fenotípicos asociados a la sensibilidad a fungicidas

Se estableció el nivel de sensibilidad hacia los fungicidas evaluados a través de una IC_{50} hallada por microtécnica espectrofotométrica desde cultivos monospóricos que permitieron conocer una respuesta individual y a través de una IC_{50} hallada a partir del promedio de las longitudes alcanzadas por los tubos germinativos de un número determinado de esporas que permitieron conocer una respuesta poblacional.

Piraclostrobin

Respuesta individual. Entre los factores no se encontraron diferencias significativas entre la sensibilidad de un individuo hacia piraclostrobin y las características fenotípicas evaluadas (Cuadro 2y).

Respuesta poblacional: Entre los factores existieron diferencias significativas para el nivel de sensibilidad poblacional hacia piraclostrobin y el número de tubos germinativos (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias se encontró que una spora con un solo tubo germinativo estuvo significativamente más relacionada a una población con una menor sensibilidad a piraclostrobin ($IC_{50}=0,805$) que una spora con dos tubos germinativos, estas últimas relacionadas a una población de mayor sensibilidad sin importar si uno de los tubos mide menos de la mitad del otro ($IC_{50}=0,697$). La distribución proporcional indicó que el 89 % de la población presentó dos tubos germinativos y por lo tanto una menor IC_{50} poblacional, mientras el 11

sensitivity of an individual to piraclostrobin and the phenotypical characteristics evaluated (Table 2y).

Population Response: Among the factors there were significant differences for the level of population sensitivity to piraclostrobin and the number of germ tubes (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of averages, spores with only one germ tube were found to be significantly more related to a population with a lower sensitivity to piraclostrobin ($IC_{50}=0,805$) than spores with two germ tubes, the latter related to a more sensitive population, regardless of one of the tubes being less than half as long as the other ($IC_{50}=0,697$). Proportional distribution indicated that 89 % of the population presented two germ tubes, and therefore a lower population IC_{50} , whereas the remaining 11 % presented only one germ tube and a higher population IC_{50} (Table 3w). Also among the factors, significant differences were found with the production of exudate (Table 2y) and within the factors, comparing factors proved that isolated spores of a population with a lower IC_{50} ($IC_{50}=0,699$), and therefore a greater sensitivity to piraclostrobin, were significantly more related with the production of exudate in their mycelia, while the increase in the IC_{50} ($IC_{50}=0,767$) was related with no production of exudate. Proportional distribution indicated that 59 % of the population presented exudates, whereas the remaining 41 % did not (Table 3w). Among factors, the shape of the mycelium of the monosporic crop also displayed significant with the sensitivity of the population to piraclostrobin (Table 2y), and within the factors it was found, when comparing averages, that the spores from a population with a lower IC_{50} ($IC_{50}=0,703$) were significantly related with an oval shape in their mycelia, whereas if the population displayed a greater IC_{50} ($IC_{50}=0,763$) the remaining mycelium was more related to a lack

% restante presentó un solo tubo germinativo y una mayor IC_{50} poblacional (Cuadro 3w). También se halló entre los factores diferencias significativas con la producción de exudado (Cuadro 2y) y dentro de los factores se encontró que al comparar las medias las esporas aisladas de una población con una menor IC_{50} ($IC_{50} = 0,699$) y por lo tanto una mayor sensibilidad a piraclostrobin estuvieron significativamente más relacionadas con la producción de exudado en su micelio, mientras que el aumento en las IC_{50} ($IC_{50} = 0,767$) se relacionó con la ausencia en la producción de exudado. La distribución proporcional indicó que el 59 % de la población presentó exudado, mientras el 41 % restante careció de él (Cuadro 3w). Entre los factores la forma del micelio del cultivo monospórico, también exhibió diferencias significativas con la sensibilidad de la población a piraclostrobin (Cuadro 2y). Y dentro de los factores se encontró al comparar las medias que esporas provenientes de una población con una menor IC_{50} ($IC_{50} = 0,703$) estuvieron significativamente relacionadas con una forma ovoide en su micelio, mientras que si la población presentaba una mayor IC_{50} ($IC_{50} = 0,763$) el micelio resultante estuvo más relacionado a no tener una forma determinada (amorfa). La distribución proporcional indicó que el 72 % de los individuos presentaron forma ovoide y por lo tanto estuvieron relacionados con una mayor sensibilidad a piraclostrobin, mientras el 28 % restante no presentó una forma determinada (Cuadro 3w).

Epoxiconazol

Comportamiento individual. Entre los factores no se encontraron diferencias significativas entre las características fenotípicas evaluadas y la sensibilidad de los individuos monospóricos hacia epoxiconazol (Cuadro 2y).

Comportamiento poblacional. Entre los facto-

of any particular shape (amorphous). Proportional distribution indicated that 72 % of the individuals presented an oval shape, and were therefore related to a greater sensitivity to piraclostrobin, while the remaining 28 % displayed no particular shape (Table 3w).

Epoxiconazol

Individual Response. Among the factors, no significant differences were found between the phenotypic characteristics evaluated and the sensitivity of the monospore individuals to epoxiconazol (Table 2y).

Population Response. Among the factors no significant differences were found (Table 2y), although within the factors and comparing averages, it was observed that population sensitivity to epoxiconazol displayed significant differences for the trait exudate production, since isolates from a more sensitive population to this active ingredient ($IC_{50} = 0,18$) displayed exudate, while less sensitive isolates did not ($IC_{50} = 0,23$). Proportional distribution indicated that 59 % of the population presented exudate, and therefore a higher sensitivity to epoxiconazol, while the remaining 41 % displayed no exudate (Table 3x).

Tridemorf

Individual response. Among the factors, significant differences were found for the existence of ramifications in the germ tube(s) (Table 2y). And within the factors, when comparing averages, it was observed that the presence of ramifications was significantly related to a lower sensitivity to tridemorf ($IC_{50} = 32$), while the absence of ramifications was related to a higher sensitivity ($IC_{50} = 11,5$). When analyzing the proportional distribution, it was found that individuals without

res no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 2y), sin embargo dentro de los factores y al comparar entre medias se observó que la sensibilidad poblacional a epoxiconazol presentó diferencias significativas para el rasgo producción de exudado, debido a que aislamientos provenientes de una población más sensible a este ingrediente activo ($IC_{50}=0,18$) presentaron exudado mientras aislamientos menos sensibles no lo presentaron ($IC_{50}=0,23$). La distribución proporcional indicó que el 59 % de la población presentó exudado y por lo tanto una mayor sensibilidad al epoxiconazol, mientras el 41 % restante no presentó exudado (Cuadro 3x).

Tridemorf

Comportamiento individual. Entre los factores se encontraron diferencias significativas para la existencia de ramificaciones en el tubo(s) germinativo (Cuadro 2y). Y dentro de los factores al comparar las medias se observó que la presencia de ramificaciones estuvo significativamente relacionada a una menor sensibilidad a tridemorf ($IC_{50}=32$), mientras la ausencia de ramificaciones se relacionó con una mayor sensibilidad ($IC_{50}=11,5$). Al analizar la distribución proporcional se encontró que los individuos sin ramificaciones fueron minoría dentro de la población (41 %), mientras los individuos con ramificaciones y una menor sensibilidad fueron mayoría (59 %) (Cuadro 3y). Entre los factores también se observaron diferencias significativas para el color del micelio (Cuadro 2y) y dentro de los factores al comparar las medias se observó que una menor sensibilidad del cultivo monospórico a tridemorf ($IC_{50}=37,5$) estuvo significativamente relacionada con un micelio color gris, mientras si el cultivo presentaba un color blanco ($IC_{50}=13$) o rosa ($IC_{50}=14,8$) se relacionó con una sensibilidad mayor. Cuando se evaluó la distribución proporcio-

ramifications were only a few in the population (41 %), while the individuals with ramifications and a lower sensitivity were the majority (59 %) (Table 3y). Among the factors, significant differences were also observed for the color of mycelia (Table 2y), and within the factors, when comparing averages, a lower sensitivity of the monospore culture to tridemorf ($IC_{50}=37,5$) was noticed to be significantly related to a gray mycelium, whereas if its color is white ($IC_{50}=13$) or pink ($IC_{50}=14,8$) it relates to a higher sensitivity. When the proportional distribution was evaluated, grey isolates related to a lower sensitivity to tridemorph were found to be the majority and accounted for 56% of the population, while white and pink isolates were found at equal proportions of 22 % (Table 3y). Within the factors, when comparing the averages for the trait of morphology, it was noticed that if a monospore culture presented a mycelium with an irregular morphology, this individual would be significantly more related to a higher sensitivity ($IC_{50}=8,17$), since *in vitro* it would require a lower concentration of tridemorf to achieve the same level of inhibition than a monospore culture with an undefined morphology ($IC_{50}=14,8$), or circular ($IC_{50}=31,9$) or parallel ($IC_{50}=32,1$), the latter having the highest IC_{50} . The proportional distribution showed that the parallel morphology related to a lower sensitivity to tridemorph was present in a higher percentage of individuals (37 %), followed by an undefined morphology (32 %) related to a higher yet intermediate sensitivity. The irregular morphology related to the highest sensitivity to tridemorph was found at a lower proportion (19 %), while a lower percentage of individuals (12 %) presented a circular morphology, characterized by having the second lowest levels of sensitivity, very close to those observed for the parallel morphology (Table 3y).

nal se encontró que los aislamientos de color gris asociados con una menor sensibilidad a tridemorf fueron mayoría en la población y representaron el 56 %, mientras los aislamientos de color blanco y rosa se encontraron a una proporción igual del 22 % (Cuadro 3y). Dentro de los factores al comparar las medias para el del rasgo morfología, se observó que si un cultivo monospórico presentaba un micelio de morfología irregular este individuo estaría significativamente más relacionado con una sensibilidad mayor ($IC_{50}=8,17$), ya que requeriría bajo condiciones *in vitro* de una menor concentración de tridemorf para lograr el mismo nivel de inhibición que un cultivo monospórico de morfología indefinida ($IC_{50}=14,8$), circular ($IC_{50}=31,9$) y paralela ($IC_{50}=32,1$), esta última la de mayor IC_{50} . La distribución proporcional mostró que la morfología paralela asociada a una menor sensibilidad a tridemorf estaba en un mayor porcentaje de individuos (37 %), seguida de la morfología indefinida (32 %) asociada a una sensibilidad mayor pero intermedia. La morfología irregular relacionada con la mayor sensibilidad a tridemorf se encontró a una menor proporción (19 %), mientras un menor porcentaje de individuos (12 %) presentaron morfología circular, que se caracterizó por tener los segundos niveles de sensibilidad más bajos, muy cercanos a los observados para la morfología paralela (Cuadro 3y).

Comportamiento poblacional. Entre los factores no se observaron diferencias significativas (Cuadro 2y), sin embargo dentro los factores al comparar las medias se observaron diferencias significativas para la morfología del micelio. Una población con mayor sensibilidad a tridemorf se relacionó con individuos de una morfología circular ($IC_{50}=1,54$) o irregular ($IC_{50}=1,59$), mientras una sensibilidad menor al tridemorf se relacionó con individuos de una morfología indefinida ($IC_{50}=1,76$) o paralela

Population response. Among the factors there were no significant differences observed (Table 2y), although within the factors, when comparing averages, there were significant differences for the morphology of the mycelium. A population with a higher sensitivity to tridemorf was related to individuals with a circular ($IC_{50}=1,54$) or irregular morphology ($IC_{50}=1,59$), whereas a lower sensitivity to tridemorf was related to individuals with an undefined ($IC_{50}=1,76$) or parallel morphology ($IC_{50}=1,87$). In this case, proportional distribution showed that the parallel morphology related to a lower sensitivity was found in a greater proportion within the population (34%), followed by undefined (25%), irregular (22%), and circular morphologies (19%) (Table 3z).

Length of the Germ Tube and Biomass Production in Relation to Sensitivity to Fungicides

The length reached by the germ tube and the amount of biomass produced *in vitro* and in the absence of the fungicide did not display significant differences with the degree of sensitivity, acquired or inherent, of an individual or a population an individual belongs to, toward piraclostrobin, epoxiconazol, or tridemorf (Table 2z). In other words, a higher or lower IC_{50} had no relation with a longer or shorter length of the germ tube or production of biomass (Table 1).

Length of the Germ Tube in Relation to Biomass Production

In the absence of the fungicide, the length of the germ tube and the amounts of biomass were compared, and no significant differences were found between these two factors (Table 2z), that is to say, a greater or less elongation of the germ tube had no relation with the production of more or less mycelia (Table 1).

($IC_{50}=1,87$). En este caso la distribución proporcional mostró que la morfología paralela asociada con una menor sensibilidad se encontró en una mayor proporción dentro de la población (34 %), seguida de la morfología indefinida (25 %), la irregular (22 %) y la circular (19 %) (Cuadro 3z).

Longitud del tubo germinativo y producción de biomasa en relación a la sensibilidad a fungicidas

La longitud alcanzada por el tubo germinativo y la cantidad de biomasa producida bajo condiciones *in vitro* y en ausencia del fungicida no presentaron diferencias significativas con el grado de sensibilidad adquirido o inherente que tuviera un individuo o la población a la que este individuo pertenecía, hacia piraclostrobin, epoxiconazol o tridemorf (Cuadro 2z). Es decir una mayor o menor IC_{50} no tuvo relación con una mayor o menor longitud del tubo o producción de biomasa (Cuadro 1).

Longitud del tubo germinativo en relación a la producción de biomasa

Cuando en ausencia del fungicida se comparó la longitud del tubo germinativo y la cantidad de biomasa, no se encontraron diferencias significativas entre estos dos factores (Cuadro 2z), es decir una mayor o menor elongación del tubo germinativo no tuvo relación con producir más o menos micelio (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Cuando los resultados fueron analizados en relación a que rasgos fenotípicos predominaron en las poblaciones de *M. fijiensis* en Colombia, se encontró que el color del micelio fue un rasgo que a pesar de aparentemente no estar relacionado con el

DISCUSSION

When the results were analyzed for the predominant phenotypic traits in *M. fijiensis* populations in Colombia, it was found that the color of the mycelium was a trait that, although seemingly unrelated to *fitness*, it was related to representative traits such as the length of the germ tube and biomass production. The color gray was the trait that was present in the most individuals, that is, this would be a trait favored by selection, although the individuals with the highest biomass production or longer germ tubes were not of this color, that is, the gray individuals had increased their number beyond individuals with greater *fitness*. Therefore, there may be external pressures that would be selecting individuals of less *fitness*, and these pressures would be related to the action of fungicides.

The selection exerted by the fungicides would be differential according to the active ingredient and for piraclostrobin it would be causing the individuals with traits related to a higher sensitivity to be the majority (Table 3w), indicating that the individuals with greater opportunities of spreading would be sensitive to piraclostrobin. Alterations in the biological efficiency related to the resistance to QoI fungicides have been reported for other pathogenic fungi (Veloukas *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño *et al.*, 2010; Ma, B. y Tredway 2013). Monitoring the time of these traits related to higher or lower sensitivity would help determine if piraclostrobin affects the *fitness* of *M. fijiensis*, and, should this be proven, it would indicate a low risk of this fungicide generating resistance, and not a high risk, as it is currently considered (FRAC, 2014).

For both piraclostrobin and epoxiconazol, sensitive individuals presented exudates, whereas less sensitive individuals did not, indicating

fitness si estuvo relacionado con rasgos representativos como la longitud del tubo germinativo y la producción de biomasa. El color gris fue el rasgo que estuvo presente en una mayor cantidad de individuos es decir que este sería un rasgo favorecido por la selección, sin embargo los individuos de mayor producción de biomasa o mayor tubo germinativo no presentaron este color, es decir los individuos de color gris habrían aumentado su número por encima de individuos de mejor *fitness*. Por lo tanto existirían presiones externas que estarían seleccionando los individuos de menor *fitness* y estas presiones estarían relacionadas a la acción de los fungicidas.

La selección ejercida por los fungicidas sería diferencial según el ingrediente activo y para el piraclostrobin estaría provocando que los individuos con rasgos asociados a una mayor sensibilidad fueran mayoría (Cuadro 3w), indicando que los individuos con mayores oportunidades de propagación serían sensibles a piraclostrobin. Alteraciones en la eficacia biológica asociadas a la resistencia a fungicidas QoI's ya han sido reportadas para otros hongos fitopatógenos (Veloukas *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño *et al.*, 2010; Ma, B. y Tredway 2013). Un monitoreo en el tiempo de estos rasgos asociados a una mayor o menor sensibilidad ayudaría a establecer si el piraclostrobin afecta el *fitness* de *M. fijiensis* y de comprobarse indicaría que este fungicida es de bajo riesgo de generar resistencia y no de alto riesgo como se cataloga actualmente (FRAC, 2014).

Se observó que tanto para piraclostrobin como para epoxiconazol los individuos sensibles presentaron exudado mientras los menos sensibles no, indicando una posible relación entre los mecanismos que generan resistencia a estos dos ingredientes activos. La comprobación de estos resultados permitiría establecer si en *M. fijiensis* al igual que en otros hongos fitopatógenos existe resistencia

a possible relation between mechanisms that generate the resistance to these two active ingredients. Should these results be proven, it would help determine if in *M. fijiensis*, as in other pathogenic fungi in plants, there is multiple "Multidrug" resistance (MDR) between fungicides QoI and DMI (Villani and Cox 2014; Kretschmer *et al.*, 2009). Also, it would be a warning on the inconvenience of a spraying program based on the mixture of epoxiconazol and piraclostrobin due to the increase in the selection pressure on individuals tolerant to both active ingredients.

For tridemorf, the traits related to a lower sensitivity were found in a smaller percentage of the population, yet this did not mean that there was a decrease in sensitivity, since individuals from populations subjected to the pressure of fungicides (commercial properties) displayed less sensitivity than those from populations not subjected to the pressure of fungicides (wild properties) (Table 1). The explanation to these results may be related to observations on the morphology trait, where individuals related to a higher sensitivity added up to a similar population percentage to those with a lower sensitivity (Table 3y; z). These results would indicate that within the same population there would be different groups of individuals with variable levels of tolerance, in which no group would dominate in the population. This heterogeneity of sensitivities would imply the inexistence of loss in sensitivity, but it would also imply a constant presence of both sensitive and insensitive individuals.

CONCLUSIONES

Individuals were identified that expressed phenotypic traits related to the level of tolerance to an active ingredient, and this level of tolerance

múltiple “*Multidrug*” (MDR) entre fungicidas QoI y DMI (Villani y Cox 2014; Kretschmer *et al.*, 2009). Además se estaría advirtiendo a cerca de la inconveniencia de un programa de fumigación basado en la mezcla de epoxiconazol y piraclostrobin debido a que se estaría aumentando la presión de selección sobre individuos tolerantes a ambos ingredientes activos.

Para tridemorf los rasgos asociados a una menor sensibilidad se encontraron en un mayor porcentaje de la población, sin embargo esto no significó que existiera pérdida de sensibilidad, debido a que individuos provenientes de poblaciones sometidas a la presión de fungicidas (fincas comerciales) no presentaron menor sensibilidad que aquellos provenientes de poblaciones no sometidas a la presión de fungicidas (fincas silvestre) (Cuadro 1). La explicación a estos resultados puede estar relacionada a lo observado con el rasgo morfología, donde los individuos asociados a una mayor sensibilidad sumaron un porcentaje poblacional similar al de las morfologías asociadas a una menor sensibilidad (Cuadro 3y; z). Estos resultados indicarían que dentro de una misma población existirían diferentes grupos de individuos con variables niveles de tolerancia, en el que ningún grupo tendría el dominio poblacional. Esta heterogeneidad de sensibilidades implicaría la no existencia de pérdida de sensibilidad pero también implicaría una presencia constante tanto de individuos sensibles como tolerantes.

CONCLUSIONES

Se identificaron individuos que expresaron rasgos fenotípicos relacionados con el nivel de tolerancia hacia un ingrediente activo, además este nivel de tolerancia determinaría si los individuos que poseen una serie de rasgos específicos son ma-

would establish if individuals with a series of specific traits are a majority within a population or not. Therefore, a phenotypic characterization by way of monitoring would help establish when the best time would be to apply an active ingredient, depending on whether there is or not, in that moment, a greater or lower number of individuals with traits that express tolerance to that active ingredient.

Some phenotypic traits were found to be related, or in contrast, they were expressed differentially, according to the active ingredient, indicating that the phenotypic characterization could help establish which mixtures of fungicides that still belong to different families, would not lead to cross-resistance.

Acknowledgements

BASF Química staff in Colombia, Eberst de León and Julio Angulo, who have supported the investigation on resistance to fungicides and have granted access to the biological material. This investigation was carried out based on monitoring the sensitivity to fungicides in *M. fijiensis* that the Central Service Lab of the CIB has been carrying out since the year 2008.

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

yoría o no en la población. Por lo que una caracterización fenotípica a modo de monitoreo ayudaría a determinar que momento es el más propicio para la aplicación de un ingrediente activo según exista en ese momento un mayor o menor número de individuos con rasgos que expresen tolerancia hacia ese ingrediente activo.

Se encontró que algunos rasgos fenotípicos estaban relacionados o por el contrario se expresaban diferencialmente según el ingrediente activo, indicando que la caracterización fenotípica podría ayudar a determinar que mezclas de fungicidas aún pertenecientes a diferentes familias no conducirían a resistencia cruzada.

**Agradecimientos**

Personal de BASF Química en Colombia, Eberst de León y Julio Angulo, quienes han apoyado la investigación en resistencia a fungicidas y han facilitado el acceso al material biológico. Esta investigación se hizo en base al monitoreo de sensibilidad a fungicidas en *M. fijiensis* que el Laboratorio Central de Servicios de la CIB viene realizando desde el año 2008.

**LITERATURA CITADA**

- A. U. G. U. R. A. Asociación de Bananeros de Colombia, (2015). Coyuntura Bananera Colombiana 2014. Disponible en línea: <http://www.augura.com.co/servicios-gremiales/informacion-economica/>
- Chinn, B. (1997). Effectively Displaying Statistical Results in a High Volume Drug Research Environment Using SAS/GRAPH®. In *Proceedings of the Twenty-Second Annual SUGI Conference* (pp. 819-823). Disponible en línea: <http://www2.sas.com/proceedings/sugi22/INFOVIS/PAPER175.PDF>
- Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology*, 12(4), 307-328. Doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00672.X
- de Bellaire, L. D. L., Fouré, E., Abadie, C., & Carlier, J. (2010). Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits*, 65(06), 327-342. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2010034>
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A., & Pérez-García, A. (2010). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 11(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.2436/20.1501.01.38>
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. Summary banana guidelines (2014). Annual meeting minutes. Disponible en línea: <http://www.frac.info/working-group/banana-group/general-use-recommendations>
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. Monitoring Methods (2008). [www.frac.info/monitoring-methods](http://www.frac.info/monitoring-methods) (consulta, julio 2015). Disponible en línea: <http://www.frac.info/monitoring-methods>
- Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J., & Paveley, N. D. (2015). Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest management science*, 71(2), 207-215. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3781>
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., ... & Hahn, M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000696. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Ma, B., & Tredway, L. P. (2013). Induced overexpression of cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) correlates with sensitivity to demethylation inhibitors (DMIs) in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Pest management science*, 69(12), 1369-1378. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3513>
- Pérez Vicente, L. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad*, 10(1), 55-72. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116158009>
- Van Den Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M., Hobbelen, P., & Oliver, R. (2011). The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose?. *Plant Pathology*, 60(4), 597-606. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>
- Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. (2014). Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolates with Dual Resistance to SDHI and QoI Fungicides, Associated with Several *sdh B* and the *cyt b G143A* Mutations. *Phytopathology*, 104(4), 347-356. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>
- Villani, S. M., & Cox, K. D. (2014). Heteroplasmy of the cytochrome b Gene in *Venturia inaequalis* and Its Involvement in Quantitative and Practical Resistance to Trifloxystrobin. *Phytopathology*, 104(9), 945-953. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0158-R>



## Identificación y alternativas de manejo de la cenicilla del rosal

### Identification and management alternatives of powdery mildew in rosebush

**Daniel Domínguez Serrano\***, **Rómulo García Velasco** y **Martha Elena Mora Herrera**, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, km 1.5 Carr. Tenancingo-Villa Guerrero, Tenancingo, Edo. México, CP 52400, México; **Martha Lidya Salgado Siclan**, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Edo. México, CP 50200, México.  
\*Correspondencia: danusso10@hotmail.com

**Recibido:** 7 de Septiembre, 2015.

**Aceptado:** 16 de Noviembre, 2015.

Domínguez-Serrano D, García-Velasco R, Mora-Herrera ME y Salgado-Siclan ML. 2016. Identificación y alternativas de manejo de la cenicilla del rosal. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 22-42.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1509-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1509-1)

Primera Publicación DOI: 26 de Noviembre, 2025

First DOI published: November 26, 2015.

**Resumen.** La cenicilla del rosal causada por *Podosphaera pannosa* afecta todas las partes aéreas de la planta, lo que repercute en su calidad como principal componente de la pérdida económica. En el presente trabajo, se confirmó la identidad del agente causal de la cenicilla en rosa y se evaluó el efecto del fosfito de potasio ( $K_3PO_3$ ), silicio, quitosano y acetato de dodemorf sobre la incidencia y severidad de la enfermedad, así como, su respuesta en la calidad de tallos florales. Se realizaron dos ensayos (febrero-abril y mayo-julio). Las características morfométricas y moleculares del agente causal de la cenicilla correspondieron a *Podosphaera pannosa*. El  $K_3PO_3$ , silicio y quitosano redujeron

**Abstract.** Rose powdery mildew caused by *Podosphaera pannosa* affects all aerial parts of the plant, which affects their quality as a major component of economic loss. In this work, the causal agent of powdery mildew of rose was identity and confirmed, the effect of potassium phosphite ( $K_3PO_3$ ), silicon, chitosan and dodemorph acetate on the incidence and severity of the disease was evaluated, as well as their response in the quality of flower stalks. Two trials (February to April and from May to July) were performed. The morphometric and molecular characteristics of the causal agent corresponded to *Podosphaera pannosa*. The  $K_3PO_3$ , silicon and chitosan they reduced incidence and severity compared to the control for both assays, however, only the  $K_3PO_3$  and silicon, exhibited a control similar to provided by the fungicide dodemorph acetate. The treatment with chitosan increased the length and diameter of the stem and flower bud in contrast to  $K_3PO_3$  and silicon, but was not significant to the control in both tests. Based on the results, the  $K_3PO_3$ , silicon and

la incidencia y severidad con respecto al testigo para ambos ensayos; sin embargo, solo el  $K_3PO_3$  y silicio manifestaron un control similar al proporcionado por el fungicida acetato de dodemorf. El tratamiento con quitosano incrementó la longitud y diámetro del tallo y del botón floral en relación con  $K_3PO_3$  y silicio, pero no fue diferente del testigo en ambos ensayos. Con base a los resultados obtenidos, el  $K_3PO_3$ , silicio y quitosano pueden ser alternativas en el manejo de la cenicilla del rosal bajo condiciones de invernadero.

**Palabras clave:** *Podosphaera pannosa*, *Rosa* spp., severidad, incidencia, inductores.

La *Rosa* spp., es una de las especies ornamentales de mayor importancia económica a nivel mundial (Debener y Linde, 2009) con una producción anual estimada de 18 billones de tallos cortados, 60-80 millones de rosas en maceta y 220 millones de rosas para jardín (Pemberton *et al.*, 2003). No obstante, es susceptible a un gran número de enfermedades (Horst y Cloyd, 2007) como la cenicilla causada por *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr) de Bary, una de las enfermedades más destructivas que se presenta tanto en rosas cultivadas al aire libre como en invernadero (Leus *et al.*, 2006; Suthaparan *et al.*, 2012). El hongo puede infectar todas las partes aéreas de la planta y bajo condiciones favorables provoca la distorsión de hojas y defoliación prematura (Shetty *et al.*, 2012), lo que ocasiona pérdidas económicas significativas en la productividad, calidad y por ende en la comercialización (Suthaparan *et al.*, 2010).

El control de *P. pannosa* se basa principalmente en la aspersión de fungicidas a intervalos de 7-14 días (Debener y Byrne, 2014). Aplicaciones continuas de estos químicos incrementan los costos de producción y pueden generar selección de poblaciones resistentes de *P. pannosa* (Daughtrey y Ben-

chitosan are alternatives for the rosebush powdery mildew management under greenhouse conditions.

**Keywords:** *Podosphaera pannosa*, *Rosa* spp., severity, incidence, inductors.

The *Rosa* spp. is one of the ornamental species of the highest economic importance worldwide (Debener and Linde, 2009) with a yearly production estimated in 18 trillion stems cut, 60-80 million roses in pots, and 220 million garden roses (Pemberton *et al.*, 2003). However, it is vulnerable to a large number of diseases (Horst and Cloyd, 2007) such as powdery mildew, caused by *Podosphaera pannosa* (Wallr.: Fr) de Bary, one of the most destructive diseases for roses grown in the open air and greenhouses (Leus *et al.*, 2006; Suthaparan *et al.*, 2012). The fungus can infect all the aerial parts of the plant, and under favorable conditions, causes the distortion of leaves and premature defoliation (Shetty *et al.*, 2012), which causes significant economic losses in the productivity, quality, and therefore, in marketing (Suthaparan *et al.*, 2010).

The control of *P. pannosa* is based mainly on the spraying of fungicides at intervals of 7-14 days (Debener and Byrne, 2014). Continuously applying these chemicals increase production costs and may bring about selections of resistant *P. pannosa* populations (Daughtrey and Benson, 2005); also, the need to minimize the use of fungicides leads to search for control alternatives such as the use of defense inducers. Such is the case of silicon, that has proven to have potential to improve the structural and biochemical potential for resistance to diseases such as powdery mildew in different crops such as cucumbers (Liang *et al.*, 2005), strawberries and grapes (Botta *et al.*, 2011), as well as in pot roses (Shetty *et al.*, 2012). Likewise, phosphites are capable of controlling diseases in diverse crops,

son, 2005); además la necesidad de minimizar el uso de fungicidas conduce a la búsqueda de alternativas de control como el uso de inductores de defensa; tal es el caso del silicio, que ha mostrado su potencial para mejorar los componentes estructurales y bioquímicos de resistencia a enfermedades como la cenicilla en diferentes cultivos como pepino (Liang *et al.*, 2005), fresa y uva (Botta *et al.*, 2011) y en rosas para maceta (Shetty *et al.*, 2012). Así mismo, los fosfitos tienen la capacidad de controlar enfermedades en diversos cultivos, actuando directamente sobre el patógeno e indirectamente mediante la estimulación de respuestas de defensa del hospedante (Deliopoulos *et al.*, 2010); al respecto, se reportó que el fosfito de potasio induce resistencia en el cultivo de papa a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary (Machinandiarena *et al.*, 2012) y reduce significativamente la incidencia y severidad de *Oidium* sp. en pepino (*Cucumis sativus* L.) (Yañez *et al.*, 2012), en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) tuvo un efecto antifúngico inhibiendo la germinación de conidios de *Verticillium dahliae* Kleb. (Ribeiro *et al.*, 2006). Otra molécula inductora es el quitosano, un derivado de la desacetilación de la quitina, considerado como un biopolímero eficaz en la prevención de enfermedades fúngicas, al interferir directamente sobre el crecimiento de los hongos o mediante la activación de defensas en las plantas (Iriti *et al.*, 2011). Borkowski y Szwonek (2004), reportan que el quitosano presenta una alta efectividad en el control de la cenicilla del tomate (*Oidium lycopersicum* Cooke & Masee), y cuando se aplica sobre follaje de cebada (*Hordeum vulgare* L.), induce resistencia contra *Blumeria graminis* (DC.) Speer. f. sp. *hordei* (Faoro *et al.*, 2008). Por su parte, Moret *et al.* (2009) reportan que la aplicación de quitosano a concentraciones de 1 y 2.5 % reducen la severidad de *Sphaerotheca fuliginea* Schlecht ex Fr. Poll. y *Erysiphe*

acting directly upon the pathogen, and indirectly, by the stimulation of defense responses from the host (Deliopoulos *et al.*, 2010); in this regard, potassium phosphite was reported to induce resistance in potato to *Phytophthora infestans* (Mont) from Bary (Machinandiarena *et al.*, 2012) and significantly reduces the incidence and severity of *Oidium* sp. In cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Yañez *et al.*, 2012), in cocoa plantlets (*Theobroma cacao* L.), it had an antifungal effect, inhibiting the germination of *Verticillium dahliae* Kleb. (Ribeiro *et al.*, 2006) conidia. Another inducing molecule is chitosan, a derivative of the deacetylation of chitin, considered an efficient biopolymer in the prevention of fungal diseases, since it interferes directly on fungal growth or by activating defenses in plants (Iriti *et al.*, 2011). Borkowski and Szwonek (2004) report that chitosan displays high levels of effectiveness in the control of powdery mildew in tomato plants, (*Oidium lycopersicum* Cooke & Masee), and when applied on the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.), it induces resistance against *Blumeria graminis* (DC.) Speer. f. sp. *hordei* (Faoro *et al.*, 2008). On the other hand, Moret *et al.* (2009) report that applying chitosan at concentrations of 1 and 2.5 % reduces the severity of *Sphaerotheca fuliginea* Schlecht ex Fr. Poll. and *Erysiphe cichoracearum* DC. ex Merat in cucumber (*Cucumis sativus* L.).

Despite these compounds showing potential in disease control, the information of these products in treating powdery mildew in ornamental plants, and particularly in rose crops, is limited. Therefore, the aims of this study were to verify the morphometric and molecular identity of the rosebush powdery mildew, evaluate the effect of silicon, potassium phosphite, chitosan and dodemorph acetate on the incidence and severity of the pathogen under study, and quantify its effect on the length and diameter of the stem and floral bud.

*cichoracearum* DC. ex Merat en pepino (*Cucumis sativus* L.).

A pesar de que estos compuestos han mostrado potencial en el control de enfermedades, la información de estos productos en el manejo de la cenicilla en plantas ornamentales, y especialmente sobre el cultivo de rosa, es limitada. Por lo que los objetivos de este estudio fueron verificar la identidad morfológica y molecular del agente causal de la cenicilla del rosal, evaluar el efecto del silicio, fosfito de potasio, quitosano y acetato de dodemorf sobre la incidencia y severidad del patógeno en estudio y cuantificar su efecto en la longitud y diámetro del tallo y botón floral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Caracterización morfológica.** En abril de 2014 se colectaron en invernadero, hojas jóvenes de plantas de rosa var. Samourai® con síntomas y signos de cenicilla en el municipio de Tenancingo, México. Estructuras de la reproducción asexual como hifas, conidióforos y conidios, fueron desprendidos de la superficie de hojas jóvenes y con ellas se realizaron preparaciones permanentes y temporales con cinta Scotch en agua destilada e hidróxido de potasio al 3 % (Braun and Cook, 2012), en estas se observaron y midieron en el microscopio compuesto (marca Carl Zeiss®) con el objetivo de 40X, las características morfológicas de 30 repeticiones para cada estructura: diámetro del micelio, tamaño y forma de los conidios, presencia de cuerpos de fibrosina en conidios, características del conidióforo (tamaño y forma del pie de la célula, posición del septo basal), forma de los apresorios sobre las hifas y la posición de los tubos germinativos conidiales, siguiendo la clave taxonómica de Braun y Cook (2012). Para la observación de los tubos germinativos conidiales se inocularon catáfilas de cebolla con conidios del

## MATERIALS AND METHODS

**Morphometric Characterization.** In April 2014 young Samourai® variety rose leaves with symptoms and signs of powdery mildew were gathered in a greenhouse in the municipality of Tenancingo, Mexico. Structures of asexual reproduction such as hyphae, conidiophores, and conidia were detached from the surfaces of young leaves, and they were used for permanent and temporary preparations with Scotch tape in distilled water and potassium hydroxide at 3 % (Braun and Cook, 2012). In these, observations and measurements were taken in the compound microscope (Carl Zeiss®), using a 40X lens, of the morphometric characteristics of the 30 repetitions for each structure: diameter of the mycelium, size and shape of conidia, presence of fibrin bodies in conidia, characteristics of the conidiophore (size and shape of the cell base, position of the basal septum), shape of the appressoria on the hyphae and the position of the conidial germ tubes, following the taxonomical key by Braun and Cook (2012). For the observation of the conidial germ tubes, onion cataphylls were inoculated with fungal conidia (To-anun *et al.*, 2005).

**Scanning Electron Microscopy (SEM).** Sections of young leaves (0.5 cm<sup>2</sup>) from a rosebush with signs of powdery mildew were fixed in glutaraldehyde at 3 % for 24 h, and were later washed with Sorensen's phosphate buffer (0.2 M). The samples were dehydrated by sinking them in ethanol at gradual concentrations (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %) for 40 min each, and at 100 % three times for 20 min. Next, they were dried with CO<sub>2</sub> in a Samdri-780A® critical point dryer for 40 min, placed on a copper specimen rack and coated in gold in a JFC-1100® ionizer for 1 min. Finally, the

hongo (To-anun *et al.*, 2005).

#### **Microscopia electrónica de barrido (MEB).**

Fragmentos de hojas jóvenes (0.5 cm<sup>2</sup>) de rosa con signos de cenicilla se fijaron en glutaraldehído al 3 % durante 24 h, posteriormente se lavaron con buffer de fosfato Sorensen's (0.2 M). Las muestras se deshidrataron mediante la inmersión en etanol a concentraciones graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 %) por 40 min cada uno y al 100 % tres veces por 20 min. Posteriormente se secaron con CO<sub>2</sub> en un desecador de punto crítico Samdri-780A<sup>®</sup> por 40 min, se montaron en portamuestras de cobre y se recubrieron con oro en una ionizadora JFC-1100<sup>®</sup> por 1 min. Finalmente, las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL<sup>®</sup> JSM-6390.

**Caracterización molecular.** La extracción de ADN se realizó a partir de hojas con signos del hongo, mediante el kit de extracción Plant DNAzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, con modificaciones para evitar el efecto de fenoles, por lo que se realizaron cinco lavados con 300 µL de etanol al 75 %. La integridad del ADN se observó en un gel de agarosa (Ultrapure<sup>™</sup>) al 1 %, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador Syngene<sup>®</sup> modelo GVM20, la calidad y la concentración se determinaron en un biofotómetro Eppendorff<sup>®</sup> modelo D-5000-3000. El ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de agua grado biología molecular y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la prueba de PCR se utilizaron los primers ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen

preparaciones were observed and photographed in a JEOL<sup>®</sup> JSM-6390 scanning electron microscope.

**Molecular Characterization.** DNA was extracted from leaves with signs of having the fungus, using the Plant DNAzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) extraction kit, according to the protocol described by the manufacturer, with modifications to avoid the effect of phenols; for this reason, five washings were carried out with 300 µL of ethanol at 75 %. DNA integrity was observed in an agarose gel (Ultrapure<sup>™</sup>) at 1 %, the DNA strands were seen in a Syngene<sup>®</sup> GVM20 transiluminador, quality and concentration were determined using an Eppendorff<sup>®</sup> D-5000-3000 biophotometer. The DNA obtained was resuspended in 50 µL of molecular biology degree water and stored at -20 °C to be used later.

#### **Polymerase Chain Reaction (PCR).**

For the PCR test, primers ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes and Bruns, 1993) and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used (White *et al.*, 1990). The PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL de la mezcla: 6.60 µL de agua estéril desionizada (Gibco<sup>®</sup>), 10 µL of 2X Phire Plant PCR Buffer (includes 200 µM of every dNTP and 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>), 1 µL of each ITS1F and ITS4 primer at 10 µmol, 1 µL of ADN, 0.4 µL of DNA Polymerase (Phire<sup>®</sup> Hot Start II). Amplification was carried out in an MJ Research Thermal<sup>®</sup> PTC-100 thermocycler, according to the procedure described by Leus *et al.* (2006). The product of the amplification was verified by electrophoresis at 90 V for 30 min in agarose gel at 1 % and stained with 1 µL of ethidium bromide, visualization was carried out in a Syngene<sup>®</sup> GVM20 transilluminator. The DNA was purified using the DNA Clean & Concentrator

final de 20 µL de la mezcla: 6.60 µL de agua estéril desionizada (Gibco®), 10 µL de 2X Phire Plant PCR Buffer (incluye 200 µM de cada dNTP y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>), 1 µL de cada primer ITS1F e ITS4 a 10 pmol, 1 µL de ADN, 0.4 µL de DNA Polimerasa (Phire® Hot Start II). La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research Thermal®, modelo PTC-100, de acuerdo al procedimiento descrito por Leus *et al.* (2006). El producto de la amplificación se verificó mediante electroforesis a 90 V por 30 min en gel de agarosa al 1 % y tinción con 1 µL de bromuro de etidio, la visualización se realizó en un transiluminador Syngene®, modelo GVM20. El ADN se purificó con el kit comercial DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research®). Posteriormente, los fragmentos amplificados mediante la PCR fueron secuenciados en ambas direcciones en un analizador genético ABI Prism 3130XL. La secuencia obtenida fue alineada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information. La secuencia se depositó en la base del GenBank. Un cladograma se obtuvo utilizando el método Neighbor-Joining con el programa Mega 6.0.

**Experimentos en invernadero.** En plantas de rosa var. Samourai®, cultivadas bajo condiciones de invernadero se realizaron dos ensayos: el primero en los meses de febrero-abril y el segundo de mayo-julio de 2014, ambos se condujeron bajo un diseño de bloques al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones, se utilizaron 20 unidades experimentales; cada unidad experimental consistió de una parcela de 2.70 m de largo por 1 m de ancho con 27 plantas de rosa distribuidas en hilera. Mediante una poda se estimuló la producción de brotes de forma homogénea, sobre los cuales se evaluaron los tratamientos.

**Tratamientos.** Estos fueron: fosfito de potasio, quitosano, silicio como inductores de resisten-

™-5 (Zymo Research®) commercial kit. Later, the fragments amplified using the PCR were sequenced in both directions in an ABI Prism 3130XL genetic analyzer. The sequence obtained was aligned in the National Center for Biotechnology Information database. The sequence was deposited in the base of the GenBank. A cladogram was taken using the Neighbor-Joining method with the program Mega 6.0.

**Experiments in Greenhouses.** In Samourai® variety rose bushes planted in greenhouse conditions, two trials were carried out: the first, in the months of February-April, and the second, from May-July 2014; both were carried out under a randomized block design with five treatments and four repetitions, and 20 experimental units were used. Each experimental unit consisted of a plot of land 2.70 m long by 1 m wide, and contained 27 rose bushes distributed in rows. By trimming the bushes, a homogenous production of sprouts was stimulated, on which the treatments were evaluated.

**Treatments.** These were potassium phosphite, chitosan, silicon as resistance inductors; the fungicide dodemorph acetate and a control (distilled water) (Table 1). Treatments were assigned at random to each experimental unit; its application began eight days after trimming, and afterwards, at weekly intervals until reaching cutting point. Application was carried out using a motorized spray pump (Maruyama, MS072H) with a fan-shaped nozzle, during the early hours of the morning, covering the entire foliage (usage of 0.5 L per plot).

**Variables.** Ten stems were chosen at random in each experimental unit for the evaluation of the incidence and severity of the disease, length and diameter of the stem and floral bud.

**Cuadro 1.** Tratamientos evaluados en plantas de rosa var. Samourai® para el manejo de *Podosphaera pannosa*.  
**Table 1.** Treatments evaluated in rose bushes var. Samourai® for handling *Podosphaera pannosa*.

| Tratamiento         | Nombre comercial   | Concentración                                                     | <sup>x</sup> mL L <sup>-1</sup> |
|---------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Testigo             | Agua destilada     | -----                                                             | ---                             |
| Fosfito de potasio  | Nutriphite magnum® | 2 % N, 40 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 16 % K <sub>2</sub> O | 2                               |
| Quitosano           | Biorend®           | 2.5 % poly-d-glucosamina                                          | 2.5                             |
| Silicio             | Armurox®           | 2 % complejo de péptidos con silicio soluble                      | 3                               |
| Acetato de dodemorf | Meltatox®          | 400 g i.a L <sup>-1</sup> de dodemorf                             | 2                               |

<sup>x</sup>Dosis recomendadas por el fabricante / <sup>x</sup>Dose recommended by the manufacturer.

cia; el fungicida acetato de dodemorf y un testigo (agua destilada) (Cuadro 1). Los tratamientos se asignaron al azar a cada unidad experimental, su aplicación inicio ocho días después de la poda, y posteriormente a intervalos semanales hasta llegar al punto de corte. La aplicación se realizó con una bomba de aspersión motorizada (Maruyama, MS072H) con boquilla de abanico, durante las primeras horas de la mañana, realizando una cobertura total del follaje (gasto 0.5 L por parcela).

**Variabes.** Se seleccionaron 10 tallos al azar por unidad experimental para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad, longitud y diámetro del tallo y botón floral

**Evaluación de incidencia y severidad de *P. pannosa*.**

Para favorecer el desarrollo natural de la cenicilla durante el experimento se incrementó la temperatura (25-33 °C) durante el día y la humedad relativa por la noche (70-90 %) mediante el manejo de las ventilas del invernadero. La incidencia y severidad se evaluaron inmediatamente después de la aparición de los síntomas y signos, evaluaciones posteriores se realizaron semanalmente. El porcentaje de incidencia se calculó contabilizando el número de tallos con síntomas y signos con relación a los 10 tallos evaluados por unidad experimental.

**Evaluation of Incidence and Severity of *P. pannosa*.**

To enhance the natural growth of the mildew during the experiment, the temperature was raised (25-33 °C) during the day, and relative humidity by night (70-90 %) using the vents in the greenhouse. Incidence and severity were evaluated immediately after the appearance of signs and symptoms. Later evaluations were performed on a weekly basis. The percentage of incidence was calculated by counting the number of stems with symptoms and signs in relation to the 10 stems evaluated for each experimental unit.

The severity of the disease was determined using the Horsfall and Barratt scale (1945), with the classes: 0= No symptoms, 1=1-2.5 %, 2=2.6-5 %, 3=6-10 %, 4=11-25 %, 5=26-50 %, 6=51-75 %, and 7=76-100 % of the surface of the leaf damaged. The values were converted to percentages of severity using the Townsend and Heuberger equation:

$$P = \frac{\sum(n * v)}{(N * i)} * 100$$

Where: *P*= percentage of damage; *n*= total number of leaves for each class on the scale; *v*= respective degree of the scale; *N*= total number of leaves evaluated; and *i*= highest degree of the scale.

La severidad de la enfermedad se determinó mediante la escala de Horsfall y Barratt (1945), con las clases: 0= No síntomas, 1=1-2.5 %, 2=2.6-5 %, 3=6-10 %, 4=11-25 %, 5=26-50 %, 6=51-75 % y 7=76-100 % de la superficie dañada de la hoja. Los valores se transformaron a porcentaje de severidad mediante la ecuación de Townsend y Heuberger:

$$P = \frac{\sum(n * v)}{(N * i)} * 100$$

Donde:  $P$ = porcentaje de daño;  $n$ = número de hojas por cada clase en la escala;  $v$ = grado respectivo de la escala;  $N$ = número total de hojas evaluadas y  $i$ = mayor grado de la escala.

Los datos de incidencia y severidad se transformaron a área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), aplicando el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990), partiendo directamente de los porcentajes de los tallos y hojas enfermas en cada fecha de evaluación.

**Evaluación de longitud y diámetro de tallo y de botón floral.** Al término del experimento se midió la longitud del tallo (cm), desde la base hasta el ápice del mismo. El diámetro se determinó con un vernier digital CALDI-6MP mediante la toma de la lectura a un centímetro por arriba de la base del tallo. La longitud y diámetro del botón floral se midieron en punto de corte con vernier digital.

**Análisis de datos.** Los datos de las variables fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$  %) mediante el programa estadístico InfoStat, versión estudiantil 2015.

## RESULTADOS

Incidence and severity data were converted into Area under the disease progress curve (AUDPC), applying trapezoidal integration method (Campbell and Madden, 1990), starting directly from the percentages of the diseased stems and leaves in each evaluation dates.

**Evaluation of Length and Diameter of Stem and Floral Bud.** At the end of the experiment, the length of the stem was measured (cm), from the base to the apex. The diameter was determined using a CALDI-6MP digital caliper, taking the reading one centimeter above the base of the stem. The length and diameter of the floral bud were measured in the cutting point using a digital caliper.

**Data Analysis.** Data of the variables underwent a variance analysis and a Tukey comparison of averages ( $\alpha=0.05$  %) using the statistical program InfoStat, student version 2015.

## RESULTS

**Characterization of Symptoms.** The symptoms were characterized by the sporadic development of reddish to purple stains on the underside of the leaves. In the second trial, the leaves were completely colonized by the signs of the pathogen, which caused the leaflets to become deformed into a curved and/or twisted shape (Figure 1A). Some stems and peduncles showed signs of the disease (Figure 1B).

**Morphometric Characterization.** The causative agent of the disease characteristically produced mycelia, superficial and hyaline, 3-8  $\mu\text{m}$  in diameter; almost indistinguishable appresoria as protuberances; erect conidiophores up to 115  $\mu\text{m}$  long emerging from the surface of the hyphal mother cells, centrally or not; straight basal cells,

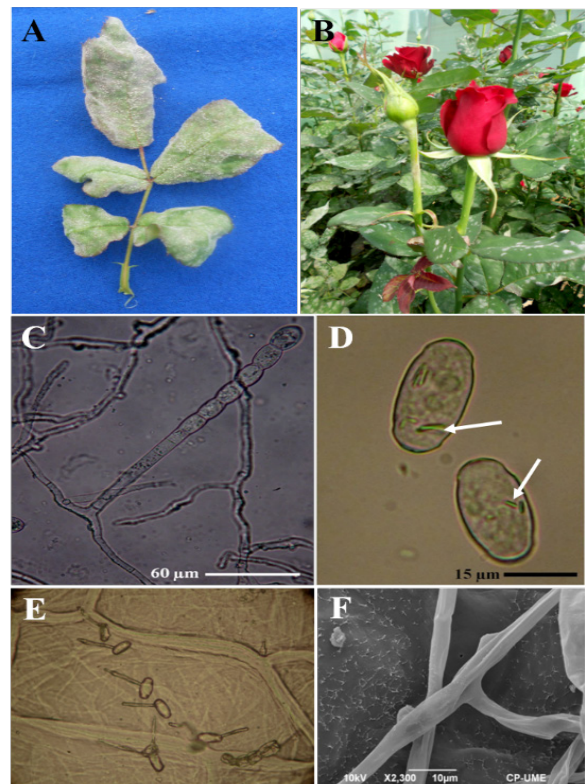


**Caracterización de síntomas.** Los síntomas se caracterizaron por el desarrollo esporádico de manchas de color rojizo a púrpura en el envés de las hojas; en el segundo ensayo las hojas fueron colonizadas totalmente por los signos del patógeno, lo que provocó la deformación de folíolos presentando una apariencia curvada y/o retorcida (Figura 1A). Algunos tallos y pedúnculos presentaron los signos de la enfermedad (Figura 1B).

**Caracterización morfométrica.** El agente causal de la enfermedad se caracterizó por producir micelio, superficial y hialino, de 3-8  $\mu\text{m}$  de diámetro; apresorios casi indistintos como protuberancias; conidióforos erectos, de hasta 115  $\mu\text{m}$  de largo, surgiendo de la superficie de las células madres hifales, central o no centralmente; células basales rectas, subcilíndricas, de 31-88 x 7-11  $\mu\text{m}$ , seguidas por 1-2 células basales cortas, formando conidios catenescentes, elipsoidales a doliformes, de 20-35 x 11-18.7  $\mu\text{m}$  con cuerpos de fibrosina; tubos germinativos  $\pm$  terminales a laterales, de 3.75-4  $\mu\text{m}$  de ancho, del tipo *Fibroidium*, subtipo *Orthotubus* (Figura 1C-1F). De acuerdo a lo anterior, las características corresponden a *P. pannosa*.

**Microscopía electrónica de barrido (MEB).** La superficie de la pared de los conidios de *P. pannosa* fue lisa (Figura 2A), presentando en algunas ocasiones ondulaciones finas; en la parte terminal de los mismos, la cual representa la ubicación del septo que separa a los conidios cuando forman cadenas, se observaron anillos concéntricos tenues (Figura 2B y 2C). En conidios parcialmente colapsados, la pared externa presentó un arrugamiento que dio origen a líneas sinuosas longitudinales y transversales (Figura 2D).

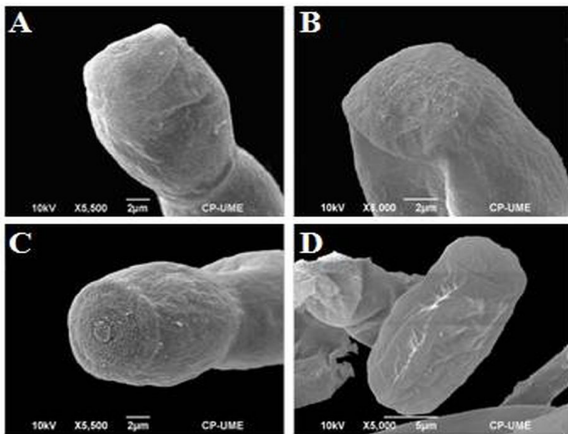
**Caracterización molecular.** Mediante la amplificación por PCR con los primers ITS1F e ITS4,



**Figura 1.** A). Deformación de folíolos causados por *P. pannosa* en rosa var. Samourai®. B). Hojas y pedúnculo con signos del hongo. C). Conidióforo emergiendo de la célula madre de la hifa con catenulación de conidios. D). Conidios elipsoidales a doliformes con cuerpos de fibrosina. E). Patrón de germinación conidial sobre catáfylls de cebolla. F). Apresorios casi indistinguibles como protuberancias sobre las hifas.

**Figure 1.** A). Deformation of leaflets caused by *P. pannosa* Samourai® var. rose bushes. B). Leaves and peduncle with signs of the fungus. C). Conidiophore emerging from the mother cell of the hyphae with a catenulation of conidia. D). Elipsoidal to doliformed Conidia with fibrin bodies. E). Conidial germination patterns on onion cataphylls. F). Almost indistinguishable appressoria as protuberances on the hyphae.

subcylindrical, 31-88 x 7-11  $\mu\text{m}$ , followed by 1-2 short basal cells, forming catenescent conidia, elipsoidal to doliform, 20-35 x 11-18.7  $\mu\text{m}$  with fibrin bodies; germ tubes  $\pm$  terminal to lateral, 3.75-4  $\mu\text{m}$  wide, of the type *Fibroidium*, subtype



**Figura 2.** Morfología de conidios de *P. pannosa*. Microscopía electrónica de barrido. A). Pared lisa del conidio, B y C). Parte terminal del mismo con anillos concéntricos tenues, D). Conidio parcialmente colapsado con ondulaciones longitudinales y transversales.

**Figure 2.** Morphology of *P. Pannosa* conidia. Scanning electron microscopy. A). Smooth wall of conidium, B and C). Terminal part of the conidium with thin concentric rings, D). Conidium partially collapsed with longitudinal and transversal undulations.

se obtuvo una secuencia de nucleótidos de 574 pb. Al comparar la secuencia de nucleótidos de este estudio (Número de depósito KP902716), con las depositadas en el GenBank, el análisis BLAST mostró un 100 % de identidad con las accesiones AB525939 (*P. pannosa* en *Rosa multiflora*), AB022348 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.), DQ139410 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.) y KF753690 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.) y 99 % con las accesiones AF011323 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.), AF298543 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.), AB525938 (*P. pannosa* en *Rosa rubiginosa*), HQ852205 (*P. pannosa* en *Rosa rugosa*) y KM001668 (*P. pannosa* en *Rosa* sp.) (Figura 3).

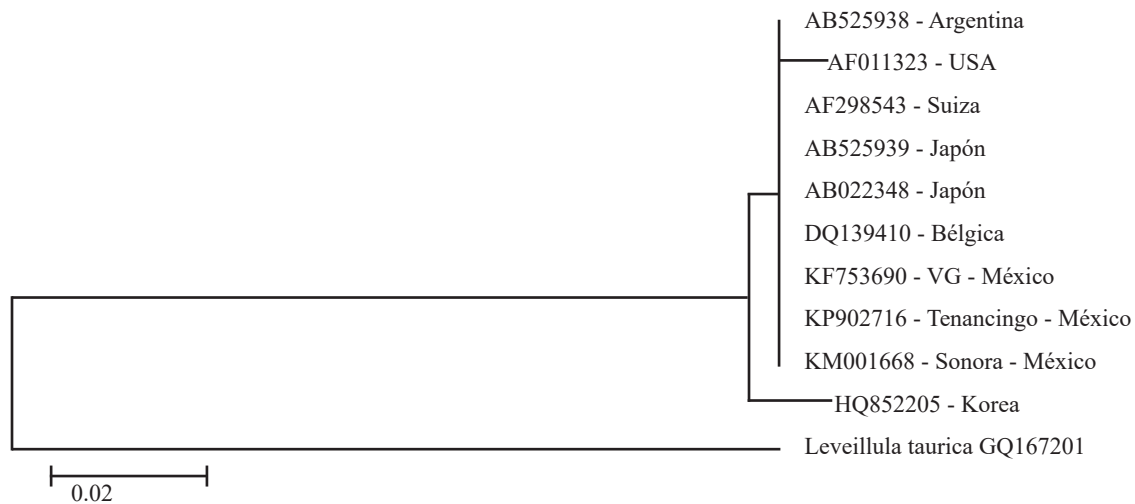
**Evaluación de incidencia y severidad de *P. pannosa*.** El ABCPE de la incidencia varió significativamente ( $P>0.05$ ) entre los diferentes tratamientos. En el primer ensayo, las plantas tratadas con quitosano, silicio y fosfito de potasio presentaron

*Orthotubus* (Figura 1C-1F). According to this, characteristics correspond to *P. pannosa*.

**Scanning Electron Microscopy (SEM).** The surface of the wall of the *P. pannosa* conidia was smooth (Figure 2A), with occasional fine waviness; in the terminal section of these, which represents the location of the septum that separates the conidia when they form chains, slight concentric rings were observed (Figure 2B and 2C). In partially collapsed conidia, the external wall presented wrinkling that produced sinuous longitudinal and transversal lines (Figure 2D).

**Molecular Characterization.** By amplification by PCR with the primers ITS1F and ITS4, a sequence of nucleotides was obtained of 574 pb. When comparing the sequence of nucleotides in this study (Deposit number KP902716), with those deposited in the GenBank, the BLAST analysis showed a 100 % of identification with accessions AB525939 (*P. pannosa* in *Rosa multiflora*), AB022348 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.), DQ139410 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.), and KF753690 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.), and 99 % with accessions AF011323 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.), AF298543 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.), AB525938 (*P. pannosa* in *Rosa rubiginosa*), HQ852205 (*P. pannosa* in *Rosa rugosa*), and KM001668 (*P. pannosa* in *Rosa* sp.) (Figure 3).

**Evaluation of Incidence and Severity of *P. pannosa*.** The AUDPC of incidence varied significantly ( $P>0.05$ ) between different treatments. In the first trial, the plants treated with chitosan, silicon, and potassium phosphite presented low incidence rates, significantly different to the control. For the second trial, only plants treated with silicon and potassium phosphite were significantly different ( $P>0.05$ ) to the control. The best treatment to reduce the incidence of the



**Figura 3.** Cladograma de *Podosphaera pannosa*. *Leveillula taurica* fue la raíz. VG= Villa Guerrero, México.  
**Figure 3.** Cladogram for *Podosphaera pannosa*. *Leveillula taurica* was the root. VG= Villa Guerrero, Mexico.

índices bajos de incidencia significativamente diferentes respecto al testigo. Para el segundo ensayo, únicamente las plantas tratadas con silicio y fosfito de potasio fueron significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) al testigo. El mejor tratamiento para reducir la incidencia de la enfermedad fue el acetato de dodemorf el cual presentó un ABCPE de 70.0 y 1400.0 para el primer y segundo ensayo, respectivamente (Cuadro 2).

En lo que se refiere a la severidad, las plantas tratadas con quitosano, fosfito de potasio y silicio; mostraron una reducción del 60.3, 83.7 y 93.5 % respectivamente, en el primer ensayo y 63.1, 77.2 y 73.9 % en el segundo ensayo, esto comparando con el testigo (Cuadro 2). En ambos ensayos, las plantas tratadas con silicio y fosfito de potasio fueron estadísticamente iguales ( $P>0.05$ ) con el fungicida acetato de dodemorf, quien presentó la menor severidad.

#### Evaluación de la longitud y diámetro del tallo y

disease was dodemorph acetate, which presented a AUDPC of 70.0 and 1400.0 for the first and second trials, respectively (Table 2).

In terms of severity, plants treated with chitosan, potassium phosphite, and silicon displayed a reduction of 60.3, 83.7, and 93.5 % respectively in the first trial, and 63.1, 77.2, and 73.9 % in the second, in comparison to the control (Table 2). In both trials, the plants treated with silicon and potassium phosphite were statistically equal ( $P>0.05$ ) with the fungicide dodemorph acetate, which displayed the least severity.

#### Evaluation of the Length and Diameter of the

**Stem and Floral Bud.** The treatment with chitosan showed an increase in stem length of 9.4 % and 20.1 % in the first and second trials, respectively, contrasting with the potassium phosphite, which induced the shortest length, with 66.7 and 64.7 cm for the first and second trials, respectively. However, the treatment with chitosan was not significantly different to the control (Table 3). In

**Cuadro 2.** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la incidencia y severidad de la cenicienta (*P. pannosa*) en el cultivo de rosa.

**Table 2.** Area under the disease progress curve (AUDPC) for the incidence and severity of powdery mildew (*P. pannosa*) in rose plantations.

| Tratamiento         | Incidencia                 |                         | Severidad                  |                         |
|---------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                     | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup> | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup> |
| Testigo             | 3517.5 <sup>A</sup>        | 2450.0 <sup>A</sup>     | 1246.9 <sup>A</sup>        | 1522.5 <sup>A</sup>     |
| Quitosano           | 2415.0 <sup>B</sup>        | 1977.5 <sup>AB</sup>    | 495.3 <sup>B</sup>         | 561.8 <sup>B</sup>      |
| Fosfito de potasio  | 1207.5 <sup>C</sup>        | 1610.0 <sup>BC</sup>    | 203.0 <sup>BC</sup>        | 347.4 <sup>BC</sup>     |
| Silicio             | 568.8 <sup>CD</sup>        | 1680.0 <sup>BC</sup>    | 81.4 <sup>C</sup>          | 398.1 <sup>BC</sup>     |
| Acetato de dodemorf | 70.0 <sup>D</sup>          | 1400.0 <sup>C</sup>     | 7.0 <sup>C</sup>           | 203.9 <sup>C</sup>      |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, Tukey ( $P>0.05$ ), <sup>x</sup> Primer ensayo, <sup>y</sup> Segundo ensayo / Averages with a letter in common are not significantly different, Tukey ( $P>0.05$ ), <sup>x</sup> First trial, <sup>y</sup> second trial.

**botón floral.** El tratamiento con quitosano mostró un incremento en la longitud de tallos de 9.4 % y 20.1 % en el primer y segundo ensayo respectivamente, contrastando con el fosfito de potasio, que indujo la menor longitud con 66.7 y 64.7 cm para el primer y segundo ensayo respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con quitosano no fue significativamente diferente respecto al testigo (Cuadro 3). En lo que respecta al diámetro del tallo, con el testigo se obtuvo el mayor diámetro con 8.0 mm y fue estadísticamente diferente ( $P>0.05$ ) al diámetro de las plantas tratadas con fosfito de potasio (7.3 mm) en el primer ensayo. Para el segundo ensayo, las plantas tratadas con fosfito de potasio y silicio

regard to the stem diameter, the control showed the greatest diameter, with 8.0 mm, and it was statistically different ( $P>0.05$ ) to the diameter in plants treated with potassium phosphite (7.3 mm) in the first trial. For the second trial, plants treated with potassium phosphite and silicon displayed lower stem diameters with 6.4 mm, whereas the treatment with chitosan showed the greatest stem diameter with 7.8 mm and no significant differences ( $P>0.05$ ) with the control (Table 3).

Regarding the length of the floral bud, potassium phosphite and silicon were significantly different ( $P>0.05$ ) to the rest of the treatments and displayed the shortest bud length with 35.6 and 37.1 mm

**Cuadro 3.** Efecto de los tratamientos en la longitud y diámetro de tallo floral en rosa variedad Samurai®.

**Table 3.** Effect of the treatments on the length and diameter of the stem of the Samurai® variety rose.

| Tratamiento         | Longitud de tallo          |                          | Diámetro de tallo          |                         |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                     | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup>  | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup> |
|                     | cm                         |                          | cm                         |                         |
| Testigo             | 76.1 ± 1.7 <sup>A</sup>    | 80.4 ± 2.0 <sup>A</sup>  | 8.0 ± 0.2 <sup>A</sup>     | 7.7 ± 0.2 <sup>A</sup>  |
| Quitosano           | 73.7 ± 1.5 <sup>A</sup>    | 81.1 ± 1.4 <sup>A</sup>  | 8.0 ± 0.2 <sup>A</sup>     | 7.8 ± 0.1 <sup>A</sup>  |
| Acetato de dodemorf | 71.3 ± 1.4 <sup>B</sup>    | 70.5 ± 1.1 <sup>B</sup>  | 7.9 ± 0.1 <sup>A</sup>     | 7.0 ± 0.2 <sup>B</sup>  |
| Silicio             | 67.0 ± 1.3 <sup>C</sup>    | 66.1 ± 1.3 <sup>BC</sup> | 7.5 ± 0.1 <sup>AB</sup>    | 6.4 ± 0.1 <sup>C</sup>  |
| Fosfito de potasio  | 66.7 ± 1.6 <sup>C</sup>    | 64.7 ± 1.2 <sup>C</sup>  | 7.3 ± 0.1 <sup>B</sup>     | 6.4 ± 0.1 <sup>C</sup>  |

Los resultados son el promedio de 10 plantas por tratamiento. ± Error estándar. Valores con una letra en común no son significativamente diferentes, Tukey ( $P>0.05$ ). <sup>x</sup> Primer ensayo, <sup>y</sup> Segundo ensayo / Results are the average of 10 plants per treatment. ± Standard Error. Values with a letter in common are not significantly different, Tukey ( $P>0.05$ ). <sup>x</sup> First trial, <sup>y</sup> second trial.

presentaron los menores diámetros del tallo con 6.4 mm, por otra parte, el tratamiento con quitosano mostró el mayor diámetro de tallo con 7.8 mm sin diferencias significativas ( $P>0.05$ ) respecto al testigo (Cuadro 3).

Respecto a la longitud de botón floral, el fosfito de potasio y silicio fueron significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) con el resto de los tratamientos y presentaron la menor longitud de botón con 35.6 y 37.1 mm respectivamente, en el primer ensayo. Pero en el segundo ensayo, el quitosano mostró un incremento sobre la longitud del botón de hasta 29.5 %, con relación al fosfito de potasio que indujo la menor longitud de botón con 34.6 mm (Cuadro 4). El diámetro de botón floral, con el tratamiento de fosfito de potasio fue de 21.6 mm para el primer y 21.2 mm en el segundo ensayo, y fué estadísticamente significativo ( $P>0.05$ ) con el quitosano que mostró diámetros de 27.8 y 26.5 mm para el primer y segundo ensayo respectivamente. Sin embargo, el quitosano no presentó diferencia estadística con el testigo en ambos ensayos (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

respectively in the first trial. However, in the second trial, chitosan displayed an increase on bud length of up to 29.5 % in relation to the potassium phosphite, which induced the shortest bud length, with 34.6 mm (Table 4). The diameter of the floral bud, with the potassium phosphite treatment, was 21.6 mm in the first treatment and 21.2 mm in the second, and was statistically different ( $P>0.05$ ) to the chitosan that showed diameters of 27.8 and 26.5 mm for the first and second trials, respectively. However, chitosan did not show any significant difference with the control in trials (Table 4).

## DISCUSSION

Based on the results of this investigation *Podospaera pannosa* (Wallr. Fr.) de Bary was identified as the causing agent of the powdery mildew in roses; the morphometric characteristics were similar to those reported by Braun and Cook (2012). However, the number of basal cells observed in this study were 1-2 short cells, which is different to reports by Havrylenko (1995) and Félix-Gastélum *et al.* (2014). These differences may be due to diverse factors such as temperature

**Cuadro 4.** Efecto de los tratamientos en la longitud y diámetro de botón floral en tallos florales de rosa variedad Samurai®.

**Table 4.** Effect of the treatments on the length and diameter of floral buds on stems of the Samurai® variety rose.

| Tratamiento         | Longitud de botón floral   |                         | Diámetro de botón floral   |                         |
|---------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                     | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup> | febrero-abril <sup>x</sup> | mayo-julio <sup>y</sup> |
|                     | mm                         |                         | mm                         |                         |
| Testigo             | 45.2±0.6 <sup>A</sup>      | 44.0±0.6 <sup>A</sup>   | 27.2±0.6 <sup>A</sup>      | 26.2±0.4 <sup>A</sup>   |
| Quitosano           | 45.2±0.5 <sup>A</sup>      | 44.8±0.7 <sup>A</sup>   | 27.8±0.3 <sup>A</sup>      | 26.5±0.5 <sup>A</sup>   |
| Acetato de dodemorf | 44.8±0.8 <sup>A</sup>      | 40.9±0.7 <sup>B</sup>   | 26.5±0.3 <sup>A</sup>      | 25.2±0.3 <sup>AB</sup>  |
| Silicio             | 37.1±0.7 <sup>B</sup>      | 39.6±0.9 <sup>B</sup>   | 23.4±0.5 <sup>B</sup>      | 23.9±0.5 <sup>B</sup>   |
| Fosfito de potasio  | 35.6±1.3 <sup>B</sup>      | 34.6±0.7 <sup>C</sup>   | 21.6±0.8 <sup>B</sup>      | 21.2±0.5 <sup>C</sup>   |

Los resultados son el promedio de 10 plantas por tratamiento. ± Error estándar. Valores con una letra en común no son significativamente diferentes, Tukey ( $P>0.05$ ). <sup>x</sup>Primer ensayo, <sup>y</sup>Segundo ensayo / Results are the average of 10 plants per treatment. ± Standard Error. Values with a letter in common are not significantly different, Tukey ( $P>0.05$ ). <sup>x</sup>First trial, <sup>y</sup>second trial.

En base a los resultados de la presente investigación se identificó a *Podosphaera pannosa* (Wallr. Fr.) de Bary como el agente causal de la cenicilla del rosal, las características morfológicas fueron similares a las reportadas por Braun y Cook (2012). Sin embargo, el número de células basales que se observaron en este estudio fueron de 1-2 células cortas, lo que difiere con lo reportado por Havrylenko (1995) y Félix-Gastélum *et al.* (2014). Las diferencias pueden deberse a diversos factores incluyendo la temperatura y humedad, el hospedero (variedad), edad de las hojas y el periodo de muestreo (Salmon, 1900). Los primers ITS1F e ITS4 amplificaron un producto de 574 pb que corresponde a *P. pannosa*; de manera similar, Félix-Gastélum *et al.* (2014) y Romberg *et al.* (2014) utilizaron los mismos primers para la identificación y detección de *P. pannosa* en el cultivo de *Rosa* spp. y *Catharanthus roseus* (L) G. Don, respectivamente. La comparación de la secuencia de nucleótidos obtenida (KP902716), con las depositadas en el GenBank, mostró una identidad del 99 al 100 % con accesiones de *P. pannosa* presentes en *Rosa* sp. en México, Bélgica, EE.UU., Japón y Suiza (Saenz y Taylor, 1999; Mori *et al.*, 2000; Cunnington *et al.*, 2003; Leus *et al.*, 2006; Félix-Gastélum *et al.*, 2014), en *Rosa multiflora* Thunberg ex Murray de Japón, *Rosa rubiginosa* L. de Argentina (Takamatsu *et al.*, 2010) y en *Rosa rugosa* Thunb. de Korea (Lee *et al.*, 2011).

Con la aplicación de los inductores silicio (Si), fosfito de potasio ( $K_3PO_3$ ) y quitosano se obtuvo una reducción de la incidencia y severidad de la cenicilla en condiciones de invernadero; sin embargo, estos tratamientos no fueron efectivos como el fungicida acetato de dodemorf que mostró los valores más bajos de incidencia y severidad de la enfermedad en ambos ensayos. Su efecto se debe a que es un fungicida sistémico con absorción acropétala que actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol y la

and humidity, the host (variety), age of the leaves, and the sampling period (Salmon, 1900). Primers ITS1F and ITS4 amplified a product of 574 pb, corresponding to *P. pannosa*; similarly, Félix-Gastélum *et al.* (2014) and Romberg *et al.* (2014) used the same primers to identify and detect *P. pannosa* in the *Rosa* spp. crop and *Catharanthus roseus* (L) G. Don crops, respectively. The comparison of the nucleotide sequence obtained (KP902716), with those deposited in the GenBank showed an identity of 99 to 100 % with *P. pannosa* accessions presents in *Rosa* sp. in Mexico, Belgium, the United States, Japan and Switzerland (Saenz and Taylor, 1999; Mori *et al.*, 2000; Cunnington *et al.*, 2003; Leus *et al.*, 2006; Félix-Gastélum *et al.*, 2014), in *Rosa multiflora* Thunberg ex Murray from Japan, *Rosa rubiginosa* L. from Argentina (Takamatsu *et al.*, 2010), and in *Rosa rugosa* Thunb. from Korea (Lee *et al.*, 2011).

With the application of the inducers silicon (Si), potassium phosphate ( $K_3PO_3$ ) and chitosan, there was a reduction in the incidence and severity of powdery mildew under greenhouse conditions. However, these treatments were not as effective as the dodemorph acetate fungicide, which displayed the lowest values for incidence and severity of the disease in both trials. Its effect is due to it being a systemic fungicide with acropetal absorption that acts inhibiting the ergosterol and protein syntheses, affecting the permeability of the membrane (Brent and Hollomon, 2007). Likewise, Benyagoub and Bélanger (1995), report that applying dodemorph acetate affects the integrity of hyphae, resulting in the collapse of conidiophores and conidia. On the other hand, there are reports claiming that applying dodemorph acetate can generate toxicity in rose plants (Bélanger *et al.*, 1994), although in our results, the fungicide displayed an excellent control of the disease and caused no loss of vigor in plants.

síntesis de proteínas, afectando la permeabilidad de la membrana (Brent y Hollomon, 2007). Así mismo Benyagoub y Bélanger (1995), reportan que la aplicación de acetato de dodemorf afecta la integridad de las hifas, resultando en un colapso de conidióforos y conidios. Por otra parte, se reporta que la aplicación de acetato de dodemorf puede generar fitotoxicidad en plantas de rosa (Bélanger *et al.*, 1994), pero en nuestros resultados el fungicida mostró un excelente control de la enfermedad sin causar pérdida en el vigor de las plantas.

Dentro de los inductores, el tratamiento con Si a dosis de 3 mL L<sup>-1</sup> redujo significativamente la incidencia y severidad de *P. pannosa* y fue estadísticamente igual con el fungicida acetato de dodemorf. Al respecto, Shetty *et al.* (2012), reportaron que la aplicación de 3.6 mM de Si (100 ppm) suministrado en solución nutritiva, reduce la severidad de *P. pannosa* hasta un 48.9 % dependiendo del genotipo del hospedante, de igual forma Datnoff *et al.* (2006), demostraron que la aplicación de Si reduce significativamente la severidad de la cenicienta hasta en un 57 % en rosas de maceta. Estos reportes sugieren que la aplicación de Si desempeña un papel importante en la supresión de la cenicienta del rosal, lo cual puede ser explicado por un incremento en la concentración de compuestos fenólicos antimicrobianos y flavonoides en respuesta a la infección por *P. pannosa* (Shetty *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que la aplicación de Si tiene efectos benéficos sobre el crecimiento y calidad de las rosas (Hwang *et al.*, 2005; Reezi *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente estudio, la aplicación de Si indujo una reducción sobre la longitud y diámetro de los tallos y del botón floral, en relación con el testigo, lo cual puede estar relacionado con la dosis de aplicación, tal como lo reportan Reezi *et al.* (2009), quienes observaron que a dosis altas de Si (150 ppm), hubo notable reducción sobre la longitud y diámetro de tallos en rosa.

Within the inductors, the treatment with Si at doses of 3 mL L<sup>-1</sup> reduced significantly the incidence and severity of *P. pannosa* and was statistically equal to the dodemorph acetate fungicide. Regarding this, Shetty *et al.* (2012) reported that applying 3.6 mM of Si (100 ppm) in a nutrient solution reduces the severity of *P. pannosa* in up to 48.9 %, depending on the genotype of the host, as Datnoff *et al.* (2006), demonstrated that applying Si reduces the severity of powdery mildew significantly, in up to 57 % in roses in pots. These reports suggest that the application of Si plays an important part in suppressing powdery mildew in rose bushes, which could be explained by an increase in the concentration of antimicrobial phenolic compounds and flavonoids in response to the infection with *P. pannosa* (Shetty *et al.*, 2011).

It has also been shown that applying Si has beneficial effects on the growth and quality of the roses (Hwang *et al.*, 2005; Reezi *et al.*, 2009). However, in this study, applying Si induced a reduction of the length and diameter of stems and floral bud in relation to the control, as reported by Reezi *et al.* (2009), who observed that with high doses of Si (150 ppm), there was a noticeable reduction in the length and diameter of rose stems. Likewise, it has been documented that applying potassium silicate (200 mg L<sup>-1</sup>) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) causes deformity in flowers and hinders growth (Kamenidou *et al.*, 2008), whereas applying sodium silicate (150 mg L<sup>-1</sup>) reduces the length of stems and causes deformity in gerbera flowers (Kamenidou *et al.*, 2010). Another possible explanation is that the addition of Si in plants could improve biotic or abiotic stress or alter their morphology (Ma and Yamaji, 2006), as observed in this present study.

Phosphites are commonly used to control oomycetes in different crops. Their efficiency has been proven against species such as *Oidium*

Así también, se ha documentado que la aplicación de silicato de potasio ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) en girasol (*Helianthus annuus* L.) provoca la deformación de flores y retrasa el crecimiento (Kamenidou *et al.*, 2008), mientras que cuando se aplica silicato de sodio ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) disminuye la longitud de tallos y causa deformación en flores de gerbera (Kamenidou *et al.*, 2010). Otra posible explicación es que el suministro de Si en las plantas puede beneficiar en la mejora a la resistencia al estrés biótico o abiótico o altera la morfología de las mismas (Ma y Yamaji, 2006), tal como se observó en este estudio.

Los fosfitos se usan comúnmente para el control de oomicetes en diferentes cultivos, su eficacia ha sido demostrada contra numerosas especies, como, *Oidium* sp. (Yáñez *et al.*, 2012), *Erysiphe polygoni* D.C. (Salamanca-Carvajal y Alvarado-Gaona, 2012), *Penicillium expansum* Link. (Amiri y Bompeix, 2011), *Phytophthora cactorum* (Lebert y Cohn) Scröt (Rebollar-Alviter *et al.*, 2010) y *Peronospora sparsa* Berkeley (Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). En este estudio, el tratamiento con  $\text{K}_3\text{PO}_3$  a dosis de  $2 \text{ mL L}^{-1}$  disminuyó significativamente la incidencia y severidad de *P. pannosa*. Resultados similares han sido reportados por Chavarro-Carrero *et al.* (2012), quienes demostraron que aplicaciones periódicas de fosfito de potasio sobre rosa variedad Bingo White® reducen la incidencia hasta un 35 % y la severidad en 6.3 % de *P. sparsa*, con una efectividad biológica del 93.4 % contra el 14.8 % de un fungicida a base de cymoxanil + hidróxido de cobre + mancozeb. Es importante destacar que el éxito que tienen los fosfitos en el control de algunas enfermedades se debe a su acción sistémica, por lo que actúan en todas las partes de la planta. Varios autores reportan que el fosfito exhibe un complejo modo de acción, actuando directamente en el desarrollo del patógeno, inhibiendo el crecimiento del micelio y la síntesis de la pared celular (King *et al.*, 2010), o indirectamente mediante la estimulación

sp. (Yáñez *et al.*, 2012), *Erysiphe polygoni* D.C. (Salamanca-Carvajal and Alvarado-Gaona, 2012), *Penicillium expansum* Link. (Amiri and Bompeix, 2011), *Phytophthora cactorum* (Lebert and Cohn) Scröt (Rebollar-Alviter *et al.*, 2010), and *Peronospora sparsa* Berkeley (Rebollar-Alviter *et al.*, 2012). In this study, the treatment with  $\text{K}_3\text{PO}_3$  at doses of  $2 \text{ mL L}^{-1}$  significantly reduced the incidence and severity of *P. pannosa*. Similar results have been reported by Chavarro-Carrero *et al.* (2012), who demonstrated that applying potassium phosphite regularly on Bingo White® variety roses reduce incidence by up to 35 % and severity by 6.3 % of *P. sparsa*, with a biological effectiveness of 93.4 % against 14.8 % of a fungicide based on cymoxanil + copper hydroxide + mancozeb. It is important to highlight that the success of phosphites in the control of some diseases is due to its systemic action, which is why they act upon all areas of the plant. Several authors report that phosphite displays a complex form of action, acting directly on the development of the pathogen, inhibiting the growth of the mycelia and the cell wall synthesis (King *et al.*, 2010), or indirectly by the stimulation of the plants' defense responses, such as the production of phytoalexins (Lovatt and Mikkelsen, 2006; Lobato *et al.*, 2011), deposition of callose, reactive species of oxygen and the induction of proteins related to pathogenesis (Eshraghi *et al.*, 2011; Machinandiaarena *et al.*, 2012).

There have been reports on the fungistatic effect of phosphites, but also on their ability to increase flowering, yield, fruit size, total of soluble solids, and concentration of anthocyanins in some crops (Lovatt and Mikkelsen, 2006). However, in this study the potassium phosphite reduced the length and diameter of stems and floral buds in comparison to the control in both trials, which could be due to the doses applied, since there is evidence that shows



de respuestas de defensa de las plantas como la producción de fitoalexinas (Lovatt y Mikkelsen, 2006; Lobato *et al.*, 2011), deposición de calosa, especies reactivas de oxígeno y la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Eshraghi *et al.*, 2011; Machinandiarena *et al.*, 2012).

Se ha documentado que además del efecto fungistático, los fosfitos pueden incrementar floración, rendimiento, tamaño de fruta, total de sólidos solubles y concentración de antocianinas en algunos cultivos (Lovatt y Mikkelsen, 2006). Sin embargo, en este estudio el fosfito de potasio redujo la longitud y diámetro de tallos y de botón floral respecto al testigo, esto en ambos ensayos, lo cual pudo deberse a la dosis de aplicación, debido a que existe evidencia que demuestra que a altas concentraciones de fosfitos se induce fitotoxicidad, lo cual afecta el rendimiento (Lovatt y Mikkelsen, 2006). Resultados similares fueron reportados por Yáñez *et al.* (2012), quienes documentaron que la aplicación de sales minerales incluyendo al fosfito de potasio, no mostraron efectos significativos que repercutieran en la longitud y el número de hojas en plantas de pepino.

Por otra parte el quitosano, un polisacárido catiónico de alto peso molecular extraído de la desacetilación de los exoesqueletos de cangrejos, es un biopolímero biodegradable y no tóxico, eficaz en la prevención de enfermedades de hongos al interferir directamente en su desarrollo (Bautista-Baños *et al.*, 2006) o en la activación de procesos biológicos en tejidos del hospedante (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Iriti *et al.*, 2011). En este trabajo la aplicación de quitosano a 0.013 % disminuyó la incidencia hasta un 31.2 y 19.3 % en el primer y segundo ensayo respectivamente, la severidad también fue reducida en 60.3 % en el primer y 63.1 % en el segundo ensayo con relación al testigo. Wojdyla (2001), reportó que la aplicación de quitosano a una concentración de 0.025 a 0.2 % redujo el desa-

that high concentrations of phosphites lead to plant toxicity, which affects yield (Lovatt and Mikkelsen, 2006). Similar results were reported by Yáñez *et al.* (2012), who documented that applying mineral salts, including potassium phosphite, showed no significant effects with repercussions on the length and number of leaves in cucumber plants.

On the other hand, chitosan, a heavy cationic polysaccharide taken from the deacetylation of the exoskeletons of crabs, is a biodegradable and non-toxic biopolymer, efficient in preventing diseases caused by fungi, since they interfere directly in their growth (Bautista-Baños *et al.*, 2006) or in the activation of biological processes in host tissues (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Iriti *et al.*, 2011). In this investigation, applying at 0.013 % reduced incidence in up to 31.2 and 19.3 % in the first and second trials, respectively, and severity was also reduced by 60.3 % in the first and 63.1 % in the second trial in comparison to the control. Wojdyla (2001) reported that applying chitosan at a concentration of 0.025 to 0.2 % reduced the development of powdery mildew in roses between 43.5 and 85.4 %, similar to the chemical treatment with triforine (0.03 %). When used on *P. sparsa*, its efficiency varied between 50 and 73 %, and on *Botrytis cinerea* Pers: Fr. at concentrations of 0.1 and 0.2 %, severity decreased by 5 and 35 %, respectively. Related results indicate that weekly applications of chitosan (Biochikol 020 PC), increase tolerances to *Diplocarpon rosae* Wolf from 18 to 60 %, yet in chrysanthemums, at a concentration of 0.01 to 0.05 % the control of *Oidium chrysanthemi* DC. was from 69 to 79 %, whereas with *Puccinia horiana* Henning, it was from 54 to 97 % (Wojdyla, 2004).

In the present study, it has been shown that applying chitosan increases the length and diameter of the stem and floral bud in relation to silicon and potassium phosphite. Some reports have shown that

rollo de la cenicilla del rosal en un rango de 43.5 a 85.4 % similar al tratamiento químico con triforine (0.03 %). Cuando se aplicó contra *P. sparsa* su eficacia varió del 50 a 73 % y al utilizarlo contra *Botrytis cinerea* Pers: Fr. a concentraciones de 0.1 y 0.2 % se redujo la severidad en un 5 y 35 %, respectivamente. Resultados relacionados indican que aplicaciones semanales de quitosano (Biochikol 020 PC), incrementan la tolerancia contra *Diplocarpon rosae* Wolf de un 18 a 60 %, pero en crisantemo a una concentración de 0.01 a 0.05 % el control de *Oidium chrysanthemi* DC. fue de 69 a 79 %, mientras que con *Puccinia horiana* Henning fue de 54 a 97 % (Wojdyla, 2004).

En el presente estudio queda evidenciado que aplicaciones de quitosano incrementan la longitud y diámetro de tallo y de botón floral en relación con el silicio y fosfito de potasio. Algunos reportes han demostrado la eficacia del quitosano para proteger plántulas contra plagas y enfermedades, mejorar la germinación de semillas, promover el crecimiento de plantas y por ende aumentar el rendimiento del cultivo. En ornamentales, la aplicación de quitosano influyó positivamente en gladiola (*Gladiolus* spp.) al incrementar la brotación de cormos, mayor número de flores por espiga y extendió la vida de florero (Ramos-García *et al.*, 2009), en cormos de fresias (*Freesia* spp.) mostró una rápida emergencia y disminuyó su ciclo vegetativo (Startek *et al.*, 2005), mientras que en orquídeas (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.) influyó en el crecimiento de brotes meristemáticos en cultivo de tejidos (Nge *et al.*, 2006) y en *Lilium* spp. mostró un incremento en la vida de florero cuando los tallos fueron sumergidos o asperjado con una solución de quitosano + nano partícula coloidal pura AG + ion (Kim *et al.*, 2005). Otras evidencias, tales como la descrita por Ohta *et al.* (2001), quienes reportaron que semillas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.)

the efficiency of chitosan to protect plantlets against pests and diseases, improve seed germination, enhance plant growth, and therefore, increase crop yield. In ornamental plants, chitosan had a positive influence on gladioli (*Gladiolus* spp.), since it increases the sprouting of corms, as well as the number of flowers per spike and prolonged its vase life (Ramos-García *et al.*, 2009); in freesia (*Freesia* spp.) corms it showed a fast emergence and reduced its vegetative cycle (Startek *et al.*, 2005), whereas in orchids (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.) it influenced the growth of meristematic sprouts in tissue culture (Nge *et al.*, 2006), and in *Lilium* spp. It displayed an increase in vase life when the stems were submerged in, or sprayed with, a solution of chitosan + pure AG colloidal nanoparticle + ion (Kim *et al.*, 2005). There is other evidence, such as that described by Ohta *et al.* (2001), who reported that seeds from lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinners) submerged in chitosan at 1 % for one hour, and applying it onto the soil, significantly increased the number of flowers and the length and diameter of the stem.

## CONCLUSIONS

Morphometric and molecular characterizations confirmed that *Podosphaera pannosa* is the agent related to the powdery mildew in rose bushes in the municipality of Tenancingo, Mexico. Applying silicia and potassium phosphite reduced the incidence and severity of *Podosphaera pannosa*, and are therefore considered feasible alternatives that can be incorporated in the integrated management of this disease. Chitosan can be an alternative in handling rose plantations, since it has positive effects on the length and diameter of the stem and floral bud. Dodemorf acetate presented

Shinners) sumergidas en quitosano al 1 % durante una hora y su aplicación en suelo aumentó significativamente el número de flores y la longitud y diámetro del tallo.

## CONCLUSIONES

La caracterización morfológica y molecular, confirmaron que *Podosphaera pannosa* es el agente asociado con la cenicilla del rosal en el municipio de Tenancingo, México. Las aplicaciones con silicio y fosfito de potasio redujeron la incidencia y severidad de *Podosphaera pannosa*, por lo que se consideran alternativas viables que pueden ser incorporadas en el manejo integrado de esta enfermedad. El quitosano puede ser una alternativa en el manejo del cultivo de rosa puesto que tiene efectos positivos sobre la longitud y diámetro del tallo y botón floral. El acetato de dodemorf mostró un excelente potencial para el control de *P. pannosa* y buena selectividad en el cultivo.

## LITERATURA CITADA

- Amiri A and Bompeix G. 2011. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. *Crop Protection* 30:222-227.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.10.010>
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E and Wilson CL. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25:108-118.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
- Bélanger RR, Labbé C and Jarvis WR. 1994. Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. *Plant Disease* 78:420-424.  
<http://dx.doi.org/10.1094/PD-78-0420>
- Benyagoub M and Bélanger RR. 1995. Development of a mutant strain of *Sporothrix flocculosa* with resistance to dodemorph-acetate. *Phytopathology* 85:766-770.  
<http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-85-766>
- Borkowski J and Szwoniek E. 2004. Powdery mildew control on greenhouse tomatoes by chitosan and other selected substances. *Acta Horticulturae* 633:435-438.

an excellent potential for the control of *P. pannosa* and good selectivity in the crop.

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

- <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.633.53>
- Botta A, Sierras N, Marín C and Piñol R. 2011. Powdery mildew protection with Armurox: An improved strategy for silicon application. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 1:1032-1039.
<http://dx.doi.org/10.17265/2161-6256/2011.11A.012>
- Braun U and Cook RTA. 2012. Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 707p.
- Brent KJ and Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens. Second Edition Fungicide Resistance Action Committee. Brussels, Belgium. 56p. Disponible en línea: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf?sfvrsn=8>
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. 532p.
- Chavarro-Carrero EA, García-Velasco R, González-Díaz JG, González-Cepeda LE y Jiménez-Ávila LJ. 2012. Uso del fosfito de potasio para el manejo de *Peronospora sparsa* Berkeley en *Rosa* spp. *Fitopatología Colombiana* 36:53-56.
- Cunnington JH, Takamatsu S, Lawrie AC and Pascoe IG. 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Australasian Plant Pathology* 32:421-428.
<http://dx.doi.org/10.1071/AP03045>
- Datnoff LE, Nell TA, Leonard RT and Rutherford BA. 2006. Effect of silicon on powdery mildew development on miniature potted rose. *Phytopathology* 96:S28. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/toc/phyto/96/6s>
- Daughtrey ML and Benson DM. 2005. Principles of plant health management for ornamental plants. *Annual Review of Phytopathology* 43:141-169. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140007>
- Debener T and Byrne DH. 2014. Disease resistance breeding in rose: Current status and potential of biotechnological tools. *Plant Science* 228:107-117.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.005>
- Debener T and Linde M. 2009. Exploring complex ornamental genomes: The rose as a model plant. *Critical Reviews in Plant Science* 28:267-280.
<http://dx.doi.org/10.1080/07352680903035481>
- Deliopoulos T, Kettlewell PS and Hare MC. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection* 29:1059-1075.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>
- Eshraghi L, Anderson J, Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GESTj and O'Brien PA. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence

- genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 60:1086-1095.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x>
- Faoro F, Maffi D, Cantu D and Iriti M. 2008. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: The effects of chitosan and benzothiadiazole. Biocontrol 53:387-401.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10526-007-9091-3>
- Félix-Gastélum R, Herrera-Rodríguez G, Martínez-Valenzuela C, Maldonado-Mendoza IE, Quiroz-Figueroa FR, Brito-Vega H and Espinoza-Matías S. 2014. First report of powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) of roses in Sinaloa, México. Plant Disease 98:1442.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0605-PDN>
- Gardes M and Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2:113-118. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Havrylenko M. 1995. Erysiphaceous species from Nahuel Huapi National Park, Argentina. Part I. New Zeal. New Zealand Journal of Botany 33:389-400. <http://dx.doi.org/10.1080/0028825X.1995.10412965>
- Horsfall JG and Barratt RW. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. Phytopathology 35:655. Disponible en línea: <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1986/A1986A666500001.pdf>
- Horst RK and Cloyd RA. 2007. Compendium of rose diseases and pests. Second Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 96p.
- Hwang SJ, Han-Min P and Jeong BR. 2005. Effects of potassium silicate on the growth of miniature rose 'Pinocchio' grown on rockwool and its cut flower quality. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 74:242-247. <http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.74.242>
- Iriti M, Vitalini S, Di Tommaso G, D'Amico S, Borgo M and Faoro F. 2011. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 17:263-269.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00149.x>
- Kamenidou S, Cavins TJ and Marek S. 2008. Silicon supplements affect horticultural traits of greenhouse-produced ornamental sunflowers. HortScience 43:236-239. Disponible en línea: <http://hortsci.ashspublishings.org/content/43/1/236.full>
- Kamenidou S, Cavins TJ and Marek S. 2010. Silicon supplements affect floricultural quality traits and elemental nutrient concentrations of greenhouse produced gerbera. Scientia Horticulturae 123:390-394.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.008>
- Kim JH, Lee AK and Suh JK. 2005. Effect of certain pretreatment substances on vase life and physiological character in *Lilium* spp. Acta Horticulturae 673:307-314. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.673.39>
- King M, Reeve W, Van der Hoek MB, Williams N, McComb J, O'Brien PA and Hardy GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Genetics and Genomics 284:425-435.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00438-010-0579-7>
- Lee SH, Han KS, Park JH and Shin HD. 2011. Occurrence of *Podosphaera pannosa* Teleomorph on *Rosa rugosa* from Korea. Plant Pathology Journal 27:398.
<http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2011.27.4.398>
- Leus L, Dewitte A, Van Huylbroeck J, Vanhoutte N, Van Bockstaele E and Höfte M. 2006. *Podosphaera pannosa* (syn. *Sphaerotheca pannosa*) on *Rosa* and *Prunus* spp.: Characterization of pathotypes by differential plant reactions and ITS sequences. Journal of Phytopathology 154:23-28.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01053.x>
- Liang YC, Sun WC, Si J and Römheld V. 2005. Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. Plant Pathology 54:678-685.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01246.x>
- Lobato MC, Machinandiarena MF, Tambascio C, Dosio GAA, Caldiz DO, Daleo GR, Andreu AB and Olivieri FP. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. European Journal of Plant Pathology 130:155-163.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9741-2>
- Lovatt CJ and Mikkelsen RL. 2006. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do?. Better crops With Plant Food 90:11-13. Disponible en línea: <http://www.ipni.net/publication/bettercrops.nsf/issue/BC-2006-4>
- Ma JF and Yamaji N. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. Trends in Plant Science 11:392-397.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.007>
- Machinandiarena MF, Lobato MC, Feldman ML, Daleo GR and Andreu AB. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. Journal of Plant Physiology 169:1417-1424.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.005>
- Moret A, Muñoz Z and Garcés S. 2009. Control of powdery mildew on cucumber cotyledons by chitosan. Journal of Plant Pathology 91:375-380.
<http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v91i2.967>
- Mori Y, Sato Y and Takamatsu S. 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. Mycologia 92:74-93.
<http://dx.doi.org/10.2307/3761452>
- Nge KL, Nwe N, Chandrakranchang S and Stevens WF. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Science 170:1185-1190.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.006>
- Ohta K, Asao T and Hosoki T. 2001. Effects of chitosan treatments on seedling growth, chitinase activity and flower quality in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. 'Kairyoku Wakamurasaki'. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76:612-614. Disponible en línea: http://www.jhortscib.org/Vol76/76_5/18.htm
- Pemberton HB, Kelly JW and Ferare J. 2003. Pot rose production. Pp:587-593. In: Roberts AV, Debener T and Gudin S (eds.). Encyclopedia of rose science. Academic press. Oxford, USA. 1450p.
<http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00074-4>
- Ramos-García M, Ortega-Centeno S, Hernández-Lauzardo

- AN, Alia-Tejacal I, Bosquez-Molina E and Bautista-Baños S. 2009. Response of gladiolus (*Gladiolus* spp) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. *Scientia Horticulturae* 121:480-484.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.03.002>
- Rebollar-Alviter A, Silva-Rojas HV, López-Cruz I, Boyzo-Marín J and Ellis MA. 2012. Fungicide sprays programs to manage downy mildew (dryberry) of blackberry caused by *Peronospora sparsa*. *Crop Protection* 42:49-55.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.007>
- Rebollar-Alviter A, Wilson LL, Madden LV and Ellis MA. 2010. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite with protectant efficacy of azoxystrobin and potassium phosphite for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. *Crop Protection* 29:349-353.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.009>
- Reezi S, Babalar M and Kalantari S. 2009. Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salts-tressed cut rose (*Rosa x hybrida* L.) 'Hot Lady'. *African Journal of Biotechnology* 8:1502-1508. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB09.180>
- Ribeiro JPM, Vilela RML, Borges PR, Rossi CF, Rufino AD and De Padua MA. 2006. Effect of potassium phosphite on the induction of resistance in cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) against *Verticillium dahliae* Kleb. *Ciência e Agrotecnologia* 30:629-636.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542006000400006>
- Romberg MK, Kennedy AH and Ko M. 2014. First report of the powdery mildews *Leveillula taurica* and *Podosphaera pannosa* on rose periwinkle in the United States. *Plant Disease* 98:848.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0981-PDN>
- Saenz GS and Taylor JW. 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77:150-168. <http://dx.doi.org/10.1139/b98-235>
- Salamanca-Carvajal M y Alvarado-Gaona A. 2012. Efecto de la proteína harpin y el fosfito de potasio en el control del mildew polvoso (*Erysiphe polygoni* D.C.) en tomate, en Sutamarchán (Boyacá). *Ciencia y Agricultura* 9:65-75. Disponible en línea:
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4986456>
- Salmon ES. 1900. A monograph of the Erysiphaceae. Torrey Botanical Club. New York, USA. 292p.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.97215>
- Shetty R, Fretté X, Jensen B, Shetty NP, Jensen JD, Jørgensen HJL, Newman MA and Christensen LP. 2011. Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. *Plant Physiology* 157:2194-2205. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.185215>
- Shetty R, Jensen B, Shetty NP, Hansen M, Hansen CW, Starkey KR and Jørgensen HJL. 2012. Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Pathology* 61:120-131.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02493.x>
- Startek L, Bartkowiak A, Salachna P, Kaminska M and Mazurkiewicz-Zapalowicz K. 2005. The influence of new methods of corm coating on freesia growth, development and health. *Acta Horticulturae* 673:611-616.
<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.673.84>
- Suthaparan A, Stensvand A, Solhaug KA, Torre S, Mortensen LM, Gadoury DM, Seem RC and Gislerød HR. 2012. Suppression of powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in greenhouse roses by brief exposure to supplemental UV-B radiation. *Plant Disease* 96:1653-1660.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0094-RE>
- Suthaparan A, Stensvand A, Torre S, Herrero ML, Pettersen RI, Gadoury DM and Gislerød HR. 2010. Continuous lighting reduces conidial production and germinability in the rose powdery mildew pathosystem. *Plant Disease* 94:339-344.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0339>
- Takamatsu S, Niinomi S, Harada M and Havrylenko M. 2010. Molecular phylogenetic analyses reveal a close evolutionary relationship between *Podosphaera* (Erysiphales: Erysiphaceae) and its rosaceous hosts. *Persoonia* 24:38-48.
<http://dx.doi.org/10.3767/003158510X494596>
- To-anun C, Kom-un S, Sunawan A, Fangfuk W, Sato Y and Takamatsu S. 2005. A new subgenus, *Microidium*, of *Oidium* (Erysiphaceae) on *Phyllanthus* spp. *Mycoscience* 46:1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/S10267-004-0202-Z>
- White TJ, Bruns TS, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, USA. 1990p.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wojdyla AT. 2001. Chitosan in the control of rose diseases: 6-year-trials. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Series Biological Sciences* 49:243-252. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL2003000183>
- Wojdyla AT. 2004. Chitosan (biochikol 020 PC) in the control of some ornamental foliage diseases. *Communications in Agricultural Applied Biology Science* 69:705-715. Disponible en línea:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756862>
- Yáñez JMG, León RJF, Godoy ATP, Gastélum LR, López MM, Cruz OJE y Cervantes DL. 2012. Alternativas para el control de la cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:259-270. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263123201004>

Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios

Role of Lignin in the Plant- Sedentary Endoparasitic Nematodes Interaction

Erika Lagunes-Fortiz y Emma Zavaleta-Mejía, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado. México, CP 56230, México. Correspondencia: (zavaleta@colpos.mx).

Recibido: 1 de Julio, 2015.

Aceptado: 16 de Noviembre, 2015.

Lagunes-Fortiz E y Zavaleta-Mejía E. 2016. Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34, 43-63.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1506-7](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1506-7)

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

Resumen. Los nematodos endoparásitos sedentarios introducen en el hospedante, a través de su estilete, moléculas efectoras que son previamente sintetizadas en sus glándulas esofágicas, las cuales inducen una reprogramación de la expresión génica en las células del hospedante para provocar modificaciones en el metabolismo, fisiología y estructura celular del hospedante, necesarios para la formación de sitios especializados de alimentación. La planta responde expresando mecanismos de defensa como el incremento de la actividad de enzimas clave de la ruta de los fenilpropanoides, mediante la cual se sintetizan metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas y monómeros que conforman la lignina, que tienen un papel estructural y de defensa en las plantas. Dependiendo de los cambios que se induzcan en su síntesis será el tipo de interacción planta-nematodo que se

Abstract. Sedentary endoparasitic nematodes introduce into their host, through its stylet, effector molecules that are previously synthesized in their esophageal glands, which induce reprogramming of gene expression in the host cells to promote changes in their metabolism, physiology and structure, necessary for the formation of the specialized feeding sites. The plant responds by expressing defense mechanisms such as the increase in the activity of key enzymes in the phenylpropanoid pathway, involved in the synthesis of secondary metabolites with antimicrobial properties and monomers that make up the lignin, which has a structural and defense roles in plants. The plant-nematode interaction established (compatible or incompatible), will depend on whether the changes induced in the lignin synthesis are favorable or not for the differentiation of the specialized feeding site. The aim of this review is to present information on the biosynthesis, composition and deposition of lignin, as well as the updated knowledge on its role as a potential physical barrier against the establishment of phytonematodes in incompatible interactions and their possible participation in the formation of specialized feeding sites in compatible interactions.

establezca (comptible o incompatible), en función de si los cambios son o no favorables para la diferenciación del sitio especializado de alimentación. Esta revisión tiene como objetivo presentar información sobre la biosíntesis, composición y deposición de lignina, así como el conocimiento que a la fecha se tiene, en su función como barrera física potencial contra el establecimiento de nematodos fitopatógenos en interacciones incompatibles, y su posible participación durante el proceso de formación de los sitios especializados de alimentación en las compatibles.

Palabras clave adicionales: lignina; monolignoles, pared celular, interacciones, nematodos endoparásitos.

La lignina es un polímero tridimensional complejo cuyas subunidades aromáticas son sintetizadas a través de la ruta de los fenilpropanoides (Dixon *et al.*, 2002), es además un componente fundamental que refuerza y proporciona rigidez a los tejidos vegetales (Dixon *et al.*, 2002; Weng y Chapple, 2010) y se deposita de manera abundante en células específicas de las plantas como las escleridas, traqueidas, elementos de los vasos, y fibras del xilema y floema (Vance *et al.*, 1980; Dixon *et al.*, 2002). La lignina se considera también un mecanismo de defensa importante, su biosíntesis y deposición en paredes celulares se incrementa cuando las plantas son sometidas a estrés de tipo biótico o abiótico (Weng y Chapple, 2010). Por si misma, la lignina constituye una barrera física inicial contra el ingreso de fitopatógenos en el hospedante y en algunos casos limita su crecimiento o los confina (Wuyts *et al.*, 2006). Al depositarse en las paredes celulares incrementa su resistencia a la degradación por enzimas (Wuyts *et al.*, 2006; Menden *et al.*, 2007), limita la difusión de toxinas secretadas por el patógeno y la de nutrientes del hospedante

Additional key words: lignin, monolignols, cell wall, interactions, endoparasitic nematodes.

Lignin is a complex three-dimensional polymer, whose aromatic subunits are synthesized through the phenylpropanoid pathway (Dixon *et al.*, 2002). It is also a basic component that reinforces and provides rigidity to plant tissues (Dixon *et al.*, 2002; Weng and Chapple, 2010) and is deposited abundantly in specific plant cells such as sclereids, tracheids, elements of the vessels, and xylem and phloem fibers (Vance *et al.*, 1980; Dixon *et al.*, 2002). Lignin is also considered an important defense mechanism; its biosynthesis and deposition in cell walls increases when plants undergo biotic or abiotic stress (Weng and Chapple, 2010). On its own, lignin is an initial physical barrier against the entry of pathogens in the host and, in some cases, it limits their growth or confines them (Wuyts *et al.*, 2006). Deposited on cell walls, it increases its resistance to degradation by enzymes (Wuyts *et al.*, 2006; Menden *et al.*, 2007), it limits the diffusion of toxins secreted by the pathogen and of nutrients from the host to the pathogen, and is also a source for the production of toxic precursors and free radicals (Nicholson and Hammerschmit, 1992).

In plant-nematode interactions, the stylets of nematodes participate in the penetration of the cell walls of its host, they help ingest the cell content and inject the effectors produced in their esophageal glands, to induce the modification of the host cells to form feeding cells. In the case of root-knot nematodes, they are known as giant cells, and are basically a product of repeated nuclear divisions without cytokinesis, whereas those induced by cyst nematodes are known as syncytia, and are a result of the fusion between protoplasts and the gradual breakup of the walls of cells that form them; both specialize feeding sites (SFS) make up a highly metabolic and multinucleated structure which will be the nematode's food source, and it

hacia el patógeno, constituye además una fuente para la producción de precursores tóxicos y radicales libres (Nicholson y Hammerschmit, 1992).

En las interacciones planta-nematodo, el estilete de los nematodos participa en la penetración de las paredes celulares de su hospedante, ayuda a ingerir el contenido celular y sirve además como canal conductor de los efectores producidos en sus glándulas esofágicas, los cuales inducen la modificación de las células de alimentación de los nematodos, en el caso de los nematodos agalladores se conocen como células gigantes y básicamente son producto de divisiones nucleares repetidas sin citocinesis, mientras que los inducidos por nematodos enquistadores se conocen como sincitios, y son producto de la fusión de protoplastos y la disolución gradual de las paredes de las células que los integran; ambos sitios especializados de alimentación (SEA) constituyen células de alimentación altamente metabólicas y multinucleadas, que serán la única fuente de alimentación del nematodo y le aportarán los nutrientes requeridos para su crecimiento y desarrollo (Hussey, 1989; Ithal *et al.*, 2007; Gheysen y Mitchum, 2011; Mitchum *et al.*, 2013). Una modificación importante que ocurre en las células hospedantes es la alteración en la lignificación de las paredes celulares; de la formación exitosa del SEA dependerá que el nematodo pueda establecerse y completar su ciclo de vida. En la presente revisión se describe la biosíntesis, estructura y composición de la lignina y el conocimiento que a la fecha se tiene de su función en la interacción planta-nematodo, tanto compatible como incompatible.

Biosíntesis y composición de la lignina

La lignina es un componente fundamental de la pared celular (PC) vegetal; la PC es un complejo extracelular dinámico, que además de la lignina, está básicamente formada por celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, cutina, suberina y sales

will provide the nutrients required for its growth and development (Hussey, 1989; Ithal *et al.*, 2007; Gheysen and Mitchum, 2011; Mitchum *et al.*, 2013). An important modification that takes place in the host cells is the alteration in the lignification of cell walls; whether the nematode will stay and complete its life cycle will depend on the successful formation of the SFS. This review describes the biosynthesis, structure, and composition of lignin and the knowledge there is to this day on its function in the plant-nematode interaction, both compatible and incompatible.

Biosynthesis and Composition of Lignin.

Lignin is a basic component of the cell wall (CW) in plants; the CW is a dynamic, extracellular complex that is formed by lignin, but also by cellulose, hemicellulose, pectin, proteins, cutin, suberin, mineral salts, and others (Bonawitz and Chapple, 2010).

Lignin biosynthesis implies the participation of two metabolic pathways, starting with the shikimate pathway for the production of L-phenylalanine and L-tyrosine, and the phenylpropanoid pathway from L-phenylalanine to the final biosynthesis of the cinnamyl alcohols (Figure 1.) (Boerjan and Baucher, 2003); in the latter pathway, not only lignin is synthesized; also, other phenolic compounds, such as (e)-stilbenes, coumarins, flavonoids and some phytoalexins (Dixon *et al.*, 2002).

The synthesis of lignin monomers (monolignols) begins with the de-amination of the phenylalanine to form cinnamic acid, and later a series of hydroxylations and subsequent *O*-methylation modify the aromatic rings of the cinnamic acid, reducing its lateral chain from an acid to an alcohol. This results in the production of monolignols: paracoumaryl alcohol (4-hidroxicinnamyl), conferyl alcohol (3-methoxy 4-hidroxicinnamyl), and sinapyl alcohol (3,5-dimethoxy

minerales, entre otros (Bonawitz y Chapple, 2010).

La biosíntesis de lignina implica la participación de dos rutas metabólicas comenzando por la ruta del shikimato para la producción de L-fenilalanina y L-tirosina, y la ruta fenilpropanoide desde la L-fenilalanina hasta la biosíntesis final de los alcoholes cinámicos (Figura 1) (Boerjan y Baucher, 2003); en esta última ruta, además de la lignina, también se sintetizan otros compuestos fenólicos, como estilbenos, coumarinas, flavonoides y algunas fitoalexinas (Dixon *et al.*, 2002).

La síntesis de los monómeros de lignina (monolignoles) comienza con la des-aminación de la fenilalanina para formar ácido cinámico, posteriormente una serie de hidroxilaciones y subsecuentes reacciones de *O*-metilación modifican los anillos aromáticos del ácido cinámico reduciendo su cadena lateral de un ácido a un alcohol. Esto da como resultado la producción de los monolignoles: alcohol *p*-coumarílico (4-hidroxicinámico), alcohol coniferílico (3-metoxi 4-hidroxicinámico) y alcohol sinapílico (3,5-dimetoxi 4-hidroxicinámico); éstos difieren en su grado de metoxilación, el alcohol coniferílico presenta un grupo metoxilo (-OCH₃) en la posición 3 del anillo aromático, el sinapílico dos metoxilos en sus posiciones 3 y 5, y el *p*-coumarílico carece de sustituyentes en su anillo aromático. Después de su incorporación al polímero de lignina, estos monómeros se refieren como unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S), respectivamente, y su disposición y abundancia determinan las propiedades físicas de la PC (Rastogi y Dwivedi, 2007; Vanholme *et al.*, 2008; Bonawitz y Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010). En general, los monómeros G y S son los principales componentes de la lignina en dicotiledóneas angiospermas, mientras que en gimnospermas la lignina consiste principalmente de monómeros de G con bajos niveles de unidades H, en cambio los pastos contienen mayor cantidad de unidades H

4-hidroxicinnamyl); these differ in their degrees of methoxylation, coniferyl alcohol displays a methoxyl group (-OCH₃) in the position 3 of the aromatic ring, sinapyl has two methoxyls in its positions 3 and 5, and paracoumaryl lacks substitutes in its aromatic ring. After their incorporation into the lignin polymer, these monomers are referred as *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacol (G), and syringyl (S) units respectively, and their dispositions and abundance determine the physical properties of the CW (Rastogi and Dwivedi, 2007; Vanholme *et al.*, 2008; Bonawitz and Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010). In general, monomers G and S are the main components of lignin in dicotyledon angiosperms, whereas in gymnosperms, lignin consists mostly of G monomers with low levels of H units, and grasses contain more H units than dicotyledons (Bonawitz and Chapple, 2010). Although lignin is generally composed of H, G, and S units, in transgenic plants with alterations of the genes that codify for both *O*-methyltransferases: CCoAOMT and COMT; atypical lignin units have also been identified, such as catechol (C) and 5-hydroxy-guaiacyl (5H) (Marita *et al.*, 2003; Vanholme *et al.*, 2010; Weng and Chapple, 2010).

The biosynthesis of monolignols requires the participation of 10 enzymes: phenylalanine ammonia lyase (PAL), three cytochrome P450-monoxygenases (cinnamate-4-hydroxylase, *p*-coumarate-3-hydroxylase and ferulate-5-hydroxylase, C4H, C3H, and F5H, respectively), two methyltransferases (caffeoyl-CoA-*O*-methyltransferase and caffeic acid caffeate-*O*-methyltransferase, CCoAOMT and COMT, respectively), and two oxidoreductases (cinnamoyl-CoA-reductase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase, CCR and CAD, respectively), as well as the enzymes 4-coumarate CoA ligase (4CL) and hydroxycinnamoyl-CoA shikimate (HCT), which are required for the synthesis of the

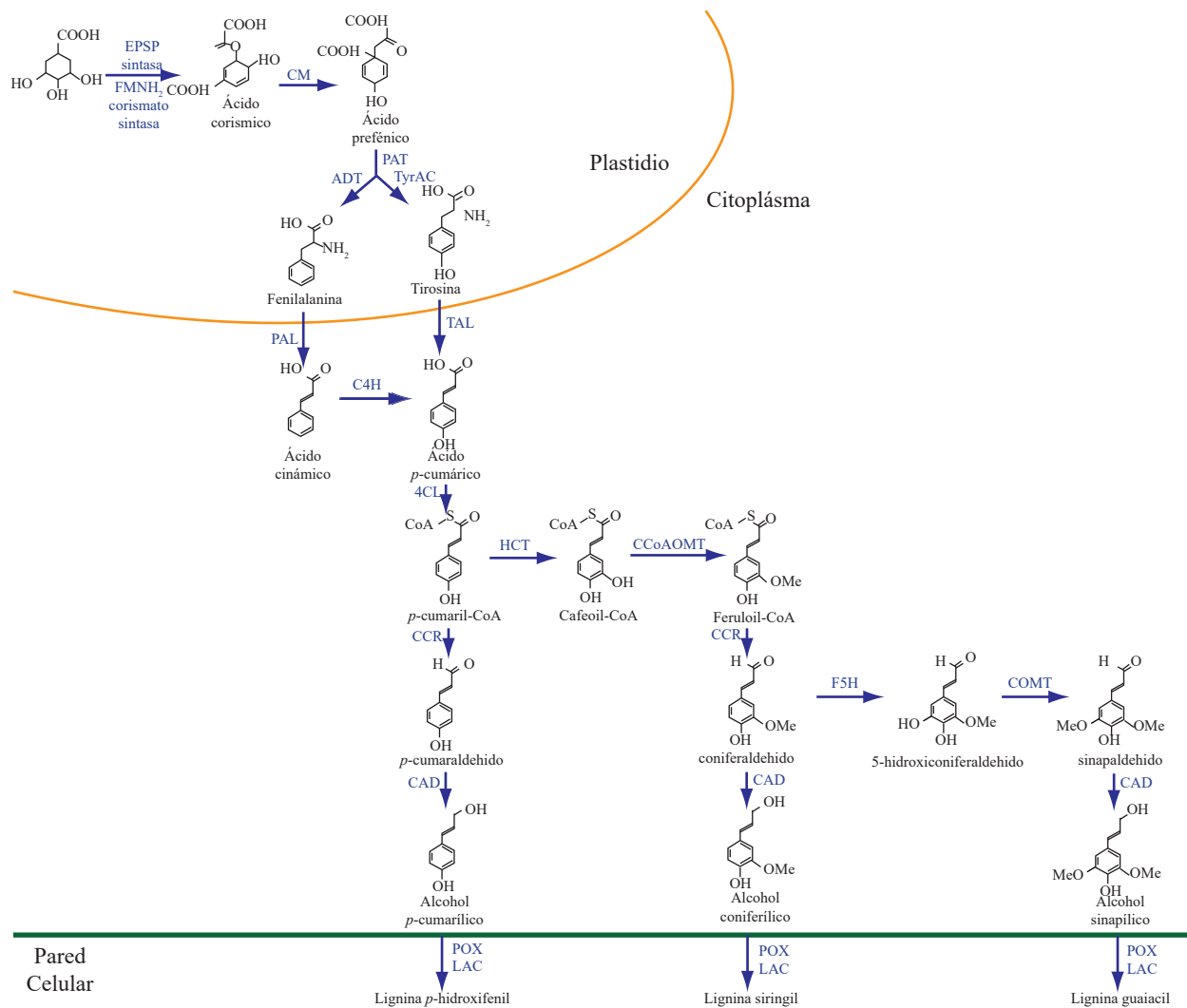


Figura 1. Rutas del shikimato (plastidio) y fenilpropanoide (citoplasma) para la biosíntesis de lignina. EPSP sintasa: ácido 5-enolpiruvilshikímico 3-P sintasa; FMNH₂ corismato sintasa: flavin mononucleótido corismato mutasa; CM: corismato mutasa; PAT: prefenato aminotransferasa; ADT: arogenato deshidratasa; TyrAC: arogenato deshidrogenasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; TAL: tirosina amoniaco liasa; C4H: cinamato-4-hidroxisilasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; HCT: hidroxycinamoiil transferasa; CCoAOMT: cafeoil CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamoiil-CoA reductasa; F5H: ferulato 5-hidroxisilasa; COMT: ácido caféico O-metiltransferasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; POX: peroxidasas; LAC: lacasas. Modificado de Liu (2012).

Figure 1. Pathways of shikimate (plastid) and phenylpropanoid (cytoplasm) for the biosynthesis of lignin. EPSP synthase: acid 5-enolpyruvylshikimate-3-P synthase; FMNH₂ chorismate synthase: flavin mononucleotide chorismate mutase; CM: chorismate mutase; PAT: prephenate aminotransferase; ADT: Arogenate dehydratase; TyrAC: arogenate dehydrogenase; PAL: phenylalanine ammonia lyase; TAL: tyrosine ammonia lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate:CoA ligase; HCT: hydroxycinnamoyl transferase; CCoAOMT: caffeoyl CoA-O-methyltransferase; CCR: cinnamoyl-CoA reductase; F5H: ferulate 5-hydroxylase; COMT: caffeic acid O-methyltransferase; CAD: cinnamyl alcohol-dehydrogenase; POX: peroxidases; LAC: lacasses. Modified from Liu (2012).

que las dicotiledóneas (Bonawitz y Chapple, 2010). Aunque la lignina generalmente se compone de las

different intermediaries that act as substrates in later reactions (Bonawitz and Chapple, 2010).

unidades H, G y S, en plantas transgénicas en las que se han alterado los genes que codifican para las dos enzimas *O*-metiltransferasas: CCoAOMT y COMT también se han identificado unidades atípicas de lignina como catecol (C) y 5-hidroxiguaiacil (5H) (Marita *et al.*, 2003; Vanholme *et al.*, 2010; Weng y Chapple, 2010).

Para la biosíntesis de monolignoles se requiere de la participación de 10 enzimas: fenilalanina amonio liasa (PAL), tres citocromo P450-monooxigenasas (cinamato-4-hidroxilasa, *p*-cumarato-3-hidroxilasa y ferulato-5-hidroxilasa, C4H, C3H y F5H, respectivamente), dos metiltransferasas (cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa y ácido caféico-*O*-metil-transferasa, CCoAOMT y COMT, respectivamente) y dos oxidoreductasas (cinamoil-CoA-reductasa y cinamoil alcohol deshidrogenasa, CCR y CAD, respectivamente), además de las enzimas 4-cumarato CoA ligasa (4CL) e hidroxicinamoil-CoA shikimato (HCT), las cuales son requeridas para la síntesis de los diferentes intermediarios que sirven como sustratos en reacciones posteriores (Bonawitz y Chapple, 2010).

Los monómeros de lignina se unen covalentemente a hemicelulosas y proveen de fuerza y rigidez a la PC de la planta y al sistema vascular le confieren la hidrofobicidad necesaria para el transporte de agua y solutos (Vanholme *et al.*, 2008); la lignina puede clasificarse en condensada y no condensada con base en el tipo de enlace que se establece entre los monolignoles y entre éstos y otros componentes de la PC (Cuadro 1). En la composición de la PC también participan los ácidos *p*-hidroxicinámicos (principalmente *p*-cumárico y ferúlico), los cuales contribuyen a la unión de la lignina con la hemicelulosa mediante enlaces éster y éter; el ácido ferúlico, es el principal responsable de los puentes entre la lignina y los polisacáridos, mientras que las uniones entre monómeros dan lugar a la conformación de una estructura tridimen-

Lignin monomers are bonded covalently to hemicelluloses and provide the plant's CW with strength and rigidity and gives the vascular system with the hydrofobicity it needs to carry water and solutes (Vanholme *et al.*, 2008); lignin can be classified as condensed and non-condensed, based on the type of bond established between the monolignols and between the former and latter components of the CW (Table 1). Also involved in the composition of the CW are *p*-hydroxycinnamic acids (mainly *p*-coumaric and ferulic acids) which contribute to the linkage of lignin with the hemicelulose by ester-ester bonds; ferulic acid is responsible for the bridges between lignin and polysaccharides, whereas bonds between monomers give way to the formation of a new three-dimensional structure (Sun *et al.*, 2002).

Both the lignification of the CW and the incorporation of each monomer are regulated in space and time and vary with the plant species, age, and tissue, and also depending on whether the cell walls are primary or secondary. In early stages of lignification, the coniferyl alcohol is copolymerized with small amounts of *p*-coumaryl in the primary wall to form lignins G and H and during the growth of the secondary CW the amount of sinapyl alcohol is copolymerized with the coniferyl alcohol to form lignin S and G (Grabber, 2005).

The monolignols precursors to lignina are synthesized in the endoplasmic reticulum of the cytosol and are later transported to the cell wall, where they are finally deposited (Santiago *et al.*, 2013). Given its relative toxicity for the cell, it has been suggested that they are exported in the form of monolignols-glucosides and once in the CW, they are converted by the action of peroxidases and/or laccases, to the units H, G, or S. The deposition of each unit in the plant tissue is controlled spacially and temporarily; first, the H units are deposited, followed by G, and finally, S (Dixon *et al.*, 2002; Bonawitz and Chapple, 2010; Santiago *et al.*,

Cuadro 1. Características de la lignina condensada y no condensada.**Table 1.** Characteristics of condensed and non-condensed lignin.

| Características | Condensada | No condensada |
|-----------------------------------|---|--|
| Tipo de enlace entre monolignoles | Enlaces C-C (β -5, β -1, 5-5 y β - β) | Enlaces aril-alquil éter (β -O-4 y 4-O-5) |
| Tipo de monolignoles | H y G | S |
| Estructura de la lignina | Ramificada | Lineal |
| Polimerización | Mayor polimerización | Menor polimerización |
| Degradabilidad | Más resistentes a la degradación, recalcitrante | Fácil degradación |

C-C: enlaces carbono-carbono; H: *p*-hidroxifenil; G: guaiacyl; S: siringil / C-C: carbon-carbon bonds; H: *p*-hydroxyphenyl; G: guaiacol; S: syringyl.

sional (Sun *et al.*, 2002).

Tanto la lignificación de la PC como la incorporación de cada monómero están reguladas en el espacio y en el tiempo y varían de acuerdo a la especie de planta, edad y tejido, y de si se trata de paredes celulares primarias o secundarias. En etapas tempranas de lignificación, el alcohol coniferílico se copolimeriza con pequeñas cantidades de *p*-coumarílico en la pared primaria para formar ligninas G y H y durante el desarrollo de la PC secundaria, se incrementa el contenido de alcohol sinapílico que se copolimeriza con el coniferil alcohol para formar lignina S y G (Grabber, 2005).

Los monolignoles precursores de la lignina, se sintetizan en el retículo endoplásmico del citosol y posteriormente se transportan a la PC en donde finalmente se depositan (Santiago *et al.*, 2013). Dada su relativa toxicidad a la célula, se ha sugerido que se exportan en forma de monolignoles-glucósidos y ya en la PC son convertidos, mediante la acción de peroxidasas y/o lacasas, a las unidades H, G o S. La deposición de cada unidad en el tejido de la planta se controla espacial y temporalmente; primero se depositan las unidades H, enseguida las G y al final las S (Dixon *et al.*, 2002; Bonawitz y Chapple, 2010; Santiago *et al.*, 2013). La composición y características de la lignina, son determinadas por la abundancia de cada uno de los monolignoles y varían considerablemente entre taxones, tipos de células, e incluso entre capas de las paredes celulares

(2013). The composition and characteristics of lignin are determined by the abundance of each one of the monolignols and vary considerably between taxons, cell types, and even between layers of the cell walls; environmental factors and the growth of the plant itself also contribute (Boerjan and Baucher, 2003; Bonawitz and Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010; Weng and Chapple, 2010).

Lignification is a highly coordinated process, and is regulated by a set of harmonized metabolic events; so far the action of 10 enzymes have been identified in the monolignols synthesis process (Sattler and Funnell-Harris, 2013). In the different species of plants, the synthesis of most of these enzymes is directed by the action of different genes and proteins present in multiple isoforms that vary in their kinetic properties and their distribution in the plant; however, the large amount of substrates, as well as the extense family of genes has made it difficult to identify and characterize the isoforms that are specifically involved in the lignification process (Bonawitz and Chapple, 2010).

PAL participates in the syntheses of different compounds of the primary and secondary metabolism, it catalyzes the non-oxidative deamination of L-phenylalanine to *trans*-cinnamic acid and is involved in the biosynthesis of salicylic acid (SA) and other phenolic compounds such as chlorogenic acid and the phytoalexins, flavonoids with antimicrobial properties, all involved

res; también contribuyen los factores ambientales y el desarrollo mismo de la planta (Boerjan y Boucher, 2003; Bonawitz y Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010; Weng y Chapple, 2010).

La lignificación es un proceso altamente coordinado y regulado por un conjunto de eventos metabólicos armonizados, hasta ahora se ha identificado la acción de 10 enzimas durante el proceso de síntesis de monolignoles (Sattler y Funnell-Harris, 2013). En las diferentes especies de plantas, la síntesis de la mayoría de estas enzimas es dirigida por la acción de diversos genes y las proteínas presentan múltiples isoformas que varían en sus propiedades cinéticas y en su distribución en la planta; sin embargo, la gran cantidad de sustratos, así como la extensa familia de genes ha dificultado la identificación y caracterización de las isoformas que están específicamente involucradas en el proceso de lignificación (Bonawitz y Chapple, 2010).

La PAL, participa en la síntesis de diferentes compuestos del metabolismo primario y secundario, cataliza la des-aminación no oxidativa de la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico y está involucrada en la biosíntesis de ácido salicílico (SA) y otros compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y las fitoalexinas, flavonoides con propiedades antimicrobianas, todos ellos implicados en la defensa en las plantas (Huang *et al.*, 2010). Consecuentemente, alteraciones en la expresión del gen *PAL* tiene un impacto fundamental durante las interacciones planta-patógeno (Sattler y Funnell-Harris, 2013), ya que participa en la formación de complejos enzimáticos, conocidos como metabolones o compartimentos metabólicos, responsables de la canalización metabólica para la síntesis de los diversos compuestos fenólicos (Rasmussen y Dixon, 1999). La síntesis de la enzima es inducida por diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Dixon y Paiva, 1995; MacDonald y D’Cunha, 2007).

La enzima C4H cataliza la hidroxilación del cinamato para producir 4-Coumarato, también cono-

in the defense of plants (Huang *et al.*, 2010). Consequently, alterations in the expression of the gene *PAL* has a crucial impact during plant-pathogen interactions (Sattler and Funnell-Harris, 2013), since it participates in the formation of enzymatic complexes, known as metabolons or metabolic compartments, responsible for the metabolic channeling for the synthesis of the diverse phenolic compounds (Rasmussen and Dixon, 1999). The enzyme synthesis is induced by different types of biotic and abiotic stress (Dixon and Paiva, 1995; MacDonald and D’Cunha, 2007).

The enzyme C4H catalyzes the hydroxylation of the cinnamate to produce 4-Coumarate, also known as paracoumarate (Fraser and Chapple, 2011), which along with enzymes F5H and C3H are mono-oxygenases dependant on cytochrome P450 that are involved in the biosynthesis of monolignols (Ehlting *et al.*, 2006; Boudet, 2007).

Enzyme 4CL catalyzes the formation of ATP dependant on the CoA thioester 4-coumaroyl CoA (*p*-coumaroylCoA). This enzyme not only is the point of entry for the biosynthesis of phenylpropanoids compounds, but also for other types of secondary metabolites such as proanthocyanidins, tannins, flavonoids, isoflavonoids, and phytoalexins (Allina *et al.*, 1998; Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Fraser and Chapple, 2011). Like PAL and C4H, 4CL exists as a family of multigenes, and although its resulting isoforms have not been fully characterized, they seem to have different functions in the secondary metabolism of plants; since its activity in different substrates and space and time expression patterns suggest different physiological functions (Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Raes *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). For example, in *Arabidopsis* isoforms *At4CL1* and *At4CL2* seem to be involved in lignification, whereas *At4CL3* acts in the biosynthesis of flavonoids (Ehlting *et al.*, 1999) and *At4CL4* probably acts in the activation of sinapate (Hamberger and Hahlbrock, 2004). During

cido como *p*-coumarato (Fraser y Chapple, 2011), ésta y las enzimas F5H y C3H son monooxigenasas dependientes del citocromo P450 que están involucradas en la biosíntesis de monolignoles (Ehlting *et al.*, 2006; Boudet, 2007).

La enzima 4CL cataliza la formación de ATP dependiente del CoA tioester 4-coumaril CoA (*p*-coumaroil CoA). Esta enzima además de representar el punto de entrada para la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, también lo es para otro tipo de metabolitos secundarios, como las proantocianidinas, taninos, flavonoides, isoflavonoides y fitoalexinas (Allina *et al.*, 1998; Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Fraser y Chapple, 2011). Al igual que PAL y C4H, 4CL existe como una familia de multigenes y aunque sus isoformas resultantes no han sido del todo caracterizadas parecen tener diferentes funciones en el metabolismo secundario de las plantas; pues su actividad en diferentes sustratos y patrones de expresión espacio-temporales, sugieren distintas funciones fisiológicas (Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Raes *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). Por ejemplo, en *Arabidopsis* las isoformas *At4CL1* y *At4CL2* parecen estar involucradas en la lignificación, mientras que *At4CL3* actúa en la biosíntesis de flavonoides (Ehlting *et al.*, 1999) y *At4CL4* probablemente participa en la activación de sinapato (Hamberger y Hahlbrock, 2004). Durante la última etapa de la biosíntesis de monolignoles en gimnospermas, los aldehídos *p*-coumarílico, coniferílico y sinapílico, son transformados a su correspondiente alcohol por la enzima CAD (Fraser y Chapple, 2011), mientras que en angiospermas SAD (sinapil alcohol deshidrogenasa) es requerida para la biosíntesis de unidades S (Li *et al.*, 2001).

Modificaciones de la PC durante la formación del SEA inducido por nematodos endoparásitos sedentarios.

Aunque en etapas tempranas las células que dan

the last stage of the biosynthesis of monolignols in gymnosperms, aldehydes *paracoumaryl*, *coniferyl*, and *sinapyl* aldehydes are transformed into their corresponding alcohol by the enzyme CAD (Fraser and Chapple, 2011), while in angiosperms SAD (sinapyl alcohol dehydrogenase) is required for the biosynthesis of S units (Li *et al.*, 2001).

Modifications of the CW during the formation of the SFS induced by Sedentary Endoparasitic Nematodes.

Although in early stages the cells that give way to the formation of giant cells and the syncytia undergo similar changes, throughout the period of formation of SEAs the progressive molecular dialog between the nematode and its host presents distinctive features, depending on whether it is a nematode that induces the formation of giant cells or syncytia; this in turn produces structural differences between both types of SFS. Changes in the CW include modifications in the thickness and extension of the CW, as well as the formation of invaginations in areas adjacent to the xylem vessels, both in giant cells and in syncytia.

In the formation of giant cells, the initial expansion zones where the thickening of the CW begins, are the first to form; these changes then extend to cover large areas of it (Rodiuc *et al.*, 2014). The mechanisms used to regulate the deposition of new material to the CW and its thickening vary, and as the giant cells form, highly reticulated regions are created from these expansion zones that resemble CW labyrinths called “invaginations”, through which the transportation of solutes into and out of the giant cell intensifies (Vieira *et al.*, 2012; Rodiuc *et al.*, 2014). Such invaginations develop throughout the process of maturation of the nematode and degenerate once it reaches its maturity and completes its life cycle (Rodiuc *et al.*, 2014).

lugar a la formación de las células gigantes y los sincitios sufren cambios similares, a lo largo del periodo de formación de los SEA, el diálogo molecular progresivo entre el nematodo y su hospedante, presenta particularidades dependiendo de si se trata de un nematodo que induce la formación de células gigantes o de sincitio; esto a su vez genera diferencias estructurales entre ambos tipos de SEA. Los cambios en la PC incluyen modificaciones en el engrosamiento y extensión de la PC, así como la formación de invaginaciones en zonas contiguas a los vasos del xilema, tanto en células gigantes como en sincitios.

En la diferenciación de las células gigantes primero se forman zonas iniciales de expansión donde comienza el engrosamiento de la PC, estos cambios se extienden para abarcar grandes regiones de la misma (Rodiuc *et al.*, 2014). Los mecanismos mediante los cuales se regula la deposición de nuevo material a la PC así como su engrosamiento son variables, y a medida que la formación de las células gigantes progresa, a partir de esas zonas de expansión se generan regiones altamente reticuladas que asemejan laberintos de PC llamadas “invaginaciones”, a través de las cuales se intensifica el transporte de solutos hacia adentro y afuera de la célula gigante (Vieira *et al.*, 2012; Rodiuc *et al.*, 2014). Dichas invaginaciones se desarrollan a lo largo del proceso de maduración del nematodo y degeneran una vez que éste alcanza su madurez y completa su ciclo de vida (Rodiuc *et al.*, 2014).

Existen reportes que revelan la importancia de los plasmodesmos durante la formación de los SEA. Los plasmodesmos son canales de membrana localizados en las paredes celulares y aportan continuidad citoplasmática entre las células, conformando una red de intercambio intercelular. De manera natural estos plasmodesmos se encuentran distribuidos en la PC de forma dispersa, mientras que en el caso de las células gigantes se forma una

There are reports that reveal the importance of the plasmodesmata during the formation of the SFS. Plasmodesmata are membrane canals located in the cell walls, which provide cytoplasmic continuity between cells, creating a network of intercellular exchange. In a natural way, these plasmodesmata are found dispersed in the CW, while in the case of giant cells, a large amount of them is formed between the walls of giant cells and on the walls that surround them (Hofmann *et al.*, 2010). This suggests the existence of a massive solute transportation system via symplast (Hofmann *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012). In addition, the flow of nutrients to and from the giant cells can also be mediated by specialized transport proteins located in the membrane (Rodiuc *et al.*, 2014).

From the beginning of the formation of the syncytium, the dissolution of cell walls, alterations in their configuration, and increases in their syntheses are evident. These changes are necessary for both the formation of invaginations in areas near the xylem and for the thickening of the CW that surrounds the syncytium (Golinowski *et al.*, 1996; Rodiuc *et al.*, 2014); since although the cell walls that make up the syncytium break, the cell walls that confine it extend and thicken to resist the increase in pressure created inside the SFS (Golinowski *et al.*, 1996). In addition, the deposition of new material obstructs the existing plasmodesmata and some neighboring cells divide and fuse and others differentiate in the new xylem (vessels) and phloem (sieve tube elements) tissues (Hoth *et al.*, 2008; Rodiuc *et al.*, 2014). As in giant cells, during the conformation of the syncytium, CW invaginations takes place near the xylem and phloem, which are elongated, branched, and form sophisticated reticulations that expand apically, making the basal parts of the invaginations fuse and wide CW thicknesses form. However, these invaginations are only evident 5 to 7 days after the

gran cantidad de ellos entre las paredes de las células gigantes y también en las paredes de las células que las rodean (Hofmann *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere la existencia de un sistema de transporte masivo de solutos vía simplasto (Hofmann *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012). Adicionalmente, el flujo de nutrientes fuera y dentro de las células gigantes también puede estar mediado por proteínas de transporte especializadas localizadas en la membrana (Rodiuc *et al.*, 2014).

Durante el inicio de la formación del sincitio son evidentes la disolución de las paredes celulares, las alteraciones en su configuración y los incrementos en su síntesis. Estos cambios son necesarios tanto para la formación de invaginaciones en regiones próximas al xilema, como para el engrosamiento de la PC que rodea al sincitio (Golinowski *et al.*, 1996; Rodiuc *et al.*, 2014); pues aunque las paredes de las células que integran el sincitio se rompen, las paredes celulares que lo delimitan se extienden y engrosan para resistir el aumento de presión generado dentro del SEA (Golinowski *et al.*, 1996). Adicionalmente la deposición de nuevo material obstruye los plasmodesmos existentes, algunas células vecinas se dividen y fusionan y otras se diferencian en nuevo tejido de xilema (vasos) y floema (elementos cribosos) (Hoth *et al.*, 2008; Rodiuc *et al.*, 2014). Al igual que en las células gigantes, durante la conformación del sincitio ocurre la formación de invaginaciones de PC cerca del xilema y floema, las cuales son elongadas, ramificadas y forman sofisticadas reticulaciones que se expanden apicalmente, haciendo que las partes basales de las invaginaciones se fusionen, conformándose amplios engrosamientos de PC; sin embargo, éstas invaginaciones sólo son evidentes a los 5 ó 7 días después de ocurrida la infección, una vez que el proceso de formación del SEA está avanzado (Golinowski *et al.*, 1996). Parece ser que en los sincitios la formación de invaginaciones en PC es una respuesta secundaria y sin relación con la dife-

infection occurs, once the process of SEA formation has advanced (Golinowski *et al.*, 1996). It seems that in the syncytia the formation of invaginations in the CW is a secondary reaction, unrelated to the differentiation of the syncytium and could be caused by an increase in the flow of solutes to the SFS (Golinowski *et al.*, 1996; Rodiuc *et al.*, 2014).

The CW of immature syncytia thickens in a uniform manner, except in sections of the wall that are in direct contact with the sieve tubes, the walls of which remain thin until the neighboring walls thicken (Grundler *et al.*, 1998). Plasmodesmata are important points of initial degradation of cell walls, and are therefore essential for the formation and expansion of the syncytium (Hofmann *et al.*, 2010); in early stages of the syncytium formation, due to the temporary deposition on callose, nutrients are transported from the phloem apoplastically through transmembrane transporters (Hofmann and Grundler, 2006; Rodiuc *et al.*, 2014); between 4 and 7 days after inoculation (dai), the amount of plasmodesmata increases and the deposition of callose decreases (Hofmann and Grundler, 2006), and in later stages, after 10 dai, the syncytia connect through the plasmodesmata, making the transfer of nutrients possible (Hofmann and Grundler, 2006; Hofmann *et al.*, 2010).

The modifications that take place during the formation of the SFS could be the result of coordinated alterations induced by the nematode through the manipulation of the expression of host genes that codify for proteins such as extensins (*EXT*), expansins (α - y β *expansinas*), pectin acetyltransferases (*PAE*), pectate lyases (*PEL*), and endoglucanases (*endo- β -1,4-glucanases*), which participate in the modification of cell walls in giant cells, whereas in syncytia it is attributed to the participation of genes that codify for expansins (α - and β *expansins*), endoglucanases (*endo- β -1,4-glucanases*), *EXT*, polygalacturonases (*PG*) y pectin acetilases (*PE*) (Rodiuc *et al.*, 2014).

renciación del sincitio y podría ser causada por un aumento en el flujo de solutos al SEA (Golinowski *et al.*, 1996; Rodiuc *et al.*, 2014).

La PC de los sincitios inmaduros se engrosa de manera uniforme, excepto en aquellos fragmentos de pared que están en contacto directo con los tubos cribosos, cuyas paredes permanecen delgadas hasta que las de las células vecinas al tubo se engrosan (Grundler *et al.*, 1998). Los plasmodesmos representan importantes puntos de inicio de degradación de paredes celulares, por lo que son esenciales para la formación y expansión del sincitio (Hofmann *et al.*, 2010); en etapas tempranas de formación del sincitio, debido a la deposición temporal de calosa, los nutrientes son transportados desde el floema de forma apoplástica a través de transportadores transmembranales (Hofmann y Grundler, 2006; Rodiuc *et al.*, 2014); entre los 4 y 7 después de la inoculación (ddi), incrementa la cantidad de plasmodesmos y disminuye la deposición de calosa (Hofmann y Grundler, 2006), y en etapas posteriores, después de los 10 ddi, los sincitios se conectan a través de los plasmodesmos haciendo posible la transferencia de nutrientes (Hofmann y Grundler, 2006; Hofmann *et al.*, 2010).

Las modificaciones que se suscitan durante la formación del SEA podrían ser el resultado de alteraciones coordinadas inducidas por el nematodo a través de la manipulación de la expresión de genes de su hospedante que codifican para proteínas tales como: extensinas (*EXT*), expansinas (α - y β *expansinas*), pectin acetilesterasas (*PAE*), pectato liasas (*PEL*) y endoglucanasas (*endo- β -1,4-glucanasas*), que participan en la modificación de paredes celulares en células gigantes, mientras que en el caso de los sincitios se atribuye la participación de genes que codifican para expansinas (α - y β *expansinas*), endoglucanasas (*endo- β -1,4-glucanasas*), *EXT*, poligalacturonasas (*PG*) y pectin acetilasas (*PE*) (Rodiuc *et al.*, 2014).

Modifications in the synthesis and accumulation of lignin in the SFS.

SFS are the only food source for sedentary endoparasitic nematodes and are essential for their growth and reproduction, which is why nematodes, through the induction of extensive changes in the gene expression, must include complex changes in the morphology, metabolism, and physiology of host cells, for their formation. SFS are found in the vascular cylinder, ensuring the necessary contact with the xylem and phloem to provide the SFS with nutrients, therefore alterations in the morphology, thickness, and composition of the CW are a necessary requirement for the formation of the SFS, and therefore, for the successful establishment of sedentary endoparasitic nematodes.

The effectors, synthesized in the oesophageal glands and secreted through the stylet of nematodes, induce the de-differentiation and re-differentiation of the root cells in SFS, although the identification of these secretions is limited (Mitchum *et al.*, 2013). It is known that of the three oesophageal glands, the two subventrals have a greater activity during the invasion of the root and the migration of the nematodes in early stages, whereas the dorsal gland increases its activity during the formation and maintenance of the SFS, that is, in the nematode's sedentary stage (Davis *et al.*, 2008; Mitchum *et al.*, 2013).

Nematodes such as *Rotylenchulus* spp., *Tylenchulus* spp., *Nacobbus* spp., and *Xiphinema* spp. Also induce the formation of SFS in the roots of hosts, although they have been studied little in comparison to those induced by the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. (giant cells) and those that form cysts (*Globodera* spp. and *Heterodera* spp., syncytiums). Both types of SFS share some structural characteristics, yet their ontogeny is different (Jones and Northcote, 1972; Rodiuc *et al.*,

Modificaciones en la síntesis y acumulación de lignina en los SEA.

Los SEA constituyen la única fuente de alimentación para los nematodos endoparásitos sedentarios y resultan esenciales para su crecimiento y reproducción, por ello los nematodos, a través de la inducción de cambios extensivos en la expresión de genes, deben inducir complejos cambios en la morfología, metabolismo y fisiología de las células hospedantes, para su conformación. Los SEA se localizan en el cilindro vascular, asegurando el contacto necesario con el xilema y floema para proveer al SEA de nutrientes, por lo tanto, alteraciones en la morfología, grosor y composición de la PC, son un requisito necesario para la formación y mantenimiento del SEA y por consiguiente, para el establecimiento exitoso de los nematodos endoparásitos sedentarios.

Los efectores, sintetizados en las glándulas esofágicas y secretados a través del estilete de los nematodos inducen la des-diferenciación y re-diferenciación de las células de la raíz en SEA, sin embargo la identificación de estas secreciones es limitada (Mitchum *et al.*, 2013). Se sabe que de las tres glándulas esofágicas, las dos subventrales tienen mayor actividad durante la invasión de la raíz y la migración de los nematodos en etapas tempranas, mientras que la glándula dorsal incrementa su actividad durante la formación y mantenimiento del SEA, es decir, en la etapa sedentaria del nematodo (Davis *et al.*, 2008; Mitchum *et al.*, 2013).

Nematodos como *Rotylenchulus* spp., *Tylenchulus* spp., *Nacobbus* spp. y *Xiphinema* spp. también inducen la formación de SEA en las raíces de sus hospedantes, aunque han sido poco estudiados en comparación con aquellos inducidos por los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. (células gigantes) y los que se enquistan (*Globodera* spp. y *Heterodera* spp., sincitios). Ambos tipos de SEA

2014). Root-knot nematodes induce the formation of giant cells when the J2 are hosted in the area of differentiation of the vascular cylinder and each individual induces the differentiation of five to seven parenchymal cells in giant multinuclear cells (Abad *et al.*, 2009). The syncytium, in turn, is formed when the J2 are hosted near the vascular cylinder and from only one cell begins the progressive thickening or narrowing of the plasmodesmata, until the cell from which the SFS formation began fuses with neighboring cells by the CW dissolution to form a large multinuclear syncytium (Turner and Rowe, 2006). In both feeding sites there is an increase in metabolic activity and cytoplasmic density, numerous small vacuoles, proliferation of organelles, particularly of the Golgi apparatus, mitochondria, plastids, ribosomes, and endoplasmic reticula (Rodiuc *et al.*, 2014).

Nematode infection promotes the synthesis of phenylpropanoids compounds (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998). The induction of lignin biosynthesis occurs as a response to biotic and abiotic stress and is considered an important defense mechanism during the plant-pathogen interaction. Although it is true that this induction will occur in every plant-nematode interaction, it is also true that the regulation of its synthesis will vary, depending on whether the interaction is compatible or incompatible. In order for the restructuring of host cells to take place during the formation of the SFS, changes in the expression in a large number of genes are crucial. In this regard, Jammes *et al.* (2005) carried out a global analysis of the *A. thaliana* transcriptome during its compatible interaction with *M. incognita* and found that out of 22089 genes monitored, 15% displayed a differential expression during the development of giant cells; the expression of genes involved in the regulation of the cell cycle, DNA processing,

comparten algunas características estructurales pero su ontogenia es diferente (Jones y Northcote, 1972; Rodiuc *et al.*, 2014). Los nematodos agalladores inducen la formación de las células gigantes cuando los J2 se alojan en la zona de diferenciación del cilindro vascular y cada individuo induce la diferenciación de cinco a siete células parenquimatosas en células gigantes multinucleadas (Abad *et al.*, 2009). El sincitio en cambio es formado cuando los J2 se alojan cerca del cilindro vascular y a partir de una sola célula ocurre el ensanchamiento o dilatación progresiva de los plasmodesmos, hasta que la célula a partir de la cual se inició la formación del SEA, se fusiona con sus células vecinas por la disolución de las paredes celulares para constituir un gran sincitio multinucleado (Turner y Rowe, 2006). En ambos sitios de alimentación existe un incremento en la actividad metabólica y densidad citoplásmica, numerosas vacuolas pequeñas, proliferación de organelos, particularmente del aparato de Golgi, mitocondrias, plastidios, ribosomas y retículo endoplásmico (Rodiuc *et al.*, 2014).

La infección por nematodos promueve la síntesis de compuestos fenilpropanoides (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998). La inducción de la biosíntesis de lignina ocurre como respuesta a estrés biótico y abiótico y se la considera un importante mecanismo de defensa durante la interacción planta-patógeno; si bien es cierto que en toda interacción planta-nematodo ocurrirá su inducción, también es cierto que la regulación de su síntesis variará dependiendo de si la interacción es compatible o incompatible. Para que ocurra la reestructuración de las células del hospedante durante la formación de los SEA, son esenciales cambios en la expresión de una gran cantidad de genes. Al respecto, Jammes *et al.* (2005) realizaron un análisis global del transcriptoma de *A. thaliana* durante su interacción compatible con *M. incognita* y encontraron que de 22089 genes monitoreados, el 15% de

protein synthesis and energy presented high levels of expression, as well as the expression of genes related to the metabolism of the cell wall that codify for pectate lyases, expansins, glycoside hydrolases, xyloglucan endotransglycosylases and one glucose oxidase; in contrast, two genes related to defense, patatin and a protein similar to germin, turned out to be the most strongly repressed; however, they do not report the monitoring of genes specifically involved in the biosynthesis of lignin.

Ithal *et al.* (2007) reported that in soya plants inoculated with the nematode *Heterodera glycines* the activity of genes implied in the pathway of the phenylpropanoids, favoring the synthesis of a wide variety of secondary metabolites in plants, such as flavonoids and anthocyanins, and lignin and suberin, which make up the cell walls. The accumulation of phytoalexins, the deposition of lignin and the accumulation of phenolic compounds are characteristic of the defense response in plants; however, the functions of these secondary metabolites in the plant-nematode interactions are not entirely clear, since although its overexpression could be a part of the response of the plant to the infection by the nematodes in an incompatible interaction, these components could play another part in a compatible interaction (Ithal *et al.*, 2007).

During the development of syncytia, the extensive thickening of its cell walls takes place, and although the composition of the new material deposited has not been characterized, histological studies show that the center of the external cortical walls, as well as the center of some fragments of cell wall inside the syncytia, become dyed with toloum chloride, indicating the presence of lignin and some polyphenoles (Jones and Northcote, 1972). In this way, the increase in the synthesis and accumulation of lignin, not only becomes part of the plant's defense against infection by nematodes, but can also contribute to the formation of the cell

ellos desplegaron una expresión diferencial durante el desarrollo de las células gigantes; la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular, procesamiento de DNA, energía y síntesis de proteínas presentaron altos niveles de expresión así como la expresión de aquellos genes asociados al metabolismo de la pared celular que codifican para pectato liasas, expansinas, glucósido hidroxilasas, xiloglucano endotransglucosilasas y una glucosil oxidasa; en contraste, dos genes relacionados con defensa, patatina y una proteína similar a la germina, resultaron ser los más fuertemente reprimidos; sin embargo, no reportan el monitoreo de genes específicamente involucrados en la biosíntesis de lignina.

Ithal *et al.* (2007) reportaron que en plantas de soya inoculadas con el nematodo *Heterodera glycines* se estimuló la actividad de genes implicados en la vía de los fenilpropanoides, favoreciendo la síntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios en las plantas, como flavonoides y antocianinas, y lignina y suberina componentes de las paredes celulares secundarias. La acumulación de fitoalexinas, la deposición de lignina y la acumulación de compuestos fenólicos caracterizan la respuesta de defensa de las plantas; sin embargo, las funciones de estos metabolitos secundarios en las interacciones planta-nematodo no están del todo claras, pues aunque su sobreexpresión podría ser parte de la respuesta de la planta a la infección por los nematodos en una interacción incompatible, estos componentes podrían desempeñar otro papel en una interacción compatible (Ithal *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo de sincitios ocurre el engrosamiento extensivo de las paredes celulares del mismo, y aunque la composición del nuevo material depositado no ha sido caracterizado, estudios histológicos muestran que el centro de las paredes corticales externas, así como en el centro de algunos fragmentos de pared celular, dentro de los sin-

wall *de novo*, to help protect and strengthen the syncytium (Ithal *et al.*, 2007). The transcription of *POX* genes that codify for peroxidases has been reported to increase during the formation of syncytia. Peroxidases not only eliminate the oxygen-reactive species produced typically as a plant's early defense response against a wide variety of pathogens (Marrs, 1996; Blokhina *et al.*, 2003), but they also seem to be involved in strengthening the cell wall of the syncytium by the crossing of cell wall polymers (Schopfer, 1996; Darley *et al.*, 2001), or by its contribution to polymerization of extensins and to the crossing of polysaccharides by the dimerization of phenols (Darley *et al.*, 2001).

The fact that most of the genes that codify for enzymes involved in the biosynthesis of lignin (*PAL*, *C4H*, *C3H*, *F5H*, *CCoAOMT*, *COMT*, *CCR*, and *CAD*) have been overexpressed in soybean during the formation of syncytium at 2, 5, and 10 days after infection by *H. glycines*, indicates that these genes also have an important function in the formation of SFS (Ithal *et al.*, 2007). In *Arabidopsis thaliana* plants that overexpressed the *C4H* (early enzyme in the pathway of the phenylpropanoids) and *F5H* (enzyme that catalyzes the irreversible hydroxylation of G precursors toward the biosynthesis of S units) enzymes, in which the production of G units was inhibited and the amount of S units increased by 50%, as compared to the wild plants, the nematode reproduction was significantly reduced (Wuyts *et al.*, 2006). The increase of S lignin in the vascular bundles might have inhibited the flow of nutrients towards the giant cells or impeded nematode feeding (Wuyts *et al.*, 2006). Similarly when the content of S units was reduced by 10% in tobacco plants in which the expression of the enzyme isoflavona O-metiltransferasa (OMT) was blocked, *M. incognita* completed its life cycle in a shorter time and there was a higher number of juveniles as compared to the plants where OMT

citios, se tiñen con azul de toluidina, indicando la presencia de lignina y algunos polifenoles (Jones y Northcote, 1972). Así el incremento en la síntesis y acumulación de la lignina, no sólo forma parte de la defensa de la planta contra la infección por nematodos, sino que también puede contribuir a la formación de pared celular *de novo*, para ayudar a proteger y fortalecer el sincitio (Ithal *et al.*, 2007). Se ha reportado que la transcripción de genes *POX* que codifican para peroxidasas, se incrementa durante la formación de sincitios; las peroxidasas, además de eliminar las especies reactivas de oxígeno producidas típicamente como respuesta de defensa temprana de las plantas, contra una amplia variedad de patógenos (Marrs, 1996; Blokhina *et al.*, 2003), también parecen estar involucradas en el fortalecimiento de la pared celular del sincitio a través del entrecruzamiento entre polímeros de pared celular (Schopfer, 1996; Darley *et al.*, 2001), o por su contribución a la polimerización de extensinas y al entrecruzamiento de polisacáridos mediante la dimerización de fenoles (Darley *et al.*, 2001).

El hecho de que la mayoría de los genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina (*PAL*, *C4H*, *C3H*, *F5H*, *CCoAOMT*, *COMT*, *CCR* y *CAD*) se hayan sobre-expresado en soya, durante la formación del sincitio a los 2, 5, y 10 días posteriores a la infección con *H. glycines*, indica que estos genes también tienen una importante función para la formación de los SEA (Ithal *et al.*, 2007). En plantas de *Arabidopsis thaliana* en las que se sobre-expresaron las enzimas *C4H* (enzima temprana en la ruta de los fenilpropanoides) y *F5H* (enzima que cataliza la hidroxilación irreversible de precursores G hacia la biosíntesis de unidades S), hubo un incremento del 50 % en el contenido de unidades S, en comparación con las plantas silvestres; mientras que la producción de unidades G se inhibió, ocasionando que en las plantas modificadas la reproducción del nemato-

was not blocked (Wuyts *et al.*, 2006). In contrast to the above, Quentin *et al.* (2009) found that in *A. thaliana* plants in which the levels of S lignin fell due to the blockage of activity in enzyme COMT, the growth of the nematode and its life cycle were similar to that observed in control plants in which the enzyme was not blocked. However, *A. thaliana* is, by nature, susceptible to *M. incognita*, and therefore in this case the differences in the content of lignin monomers (G or S) in the plant tissues did not influence the infection and life cycle of the nematode in *A. thaliana*, although one cannot exclude the possibility that in other plants, changes in the activity of enzyme COMT can determine the type of interaction (compatible or incompatible) (Pegard *et al.*, 2005).

Based on investigations cited, it is possible to infer that it is very likely that the type and predominance of the monolignols that form the lignin, specifically the type of monomeric unit (S, G, or H) deposited, can influence the infection and reproduction of sedentary endoparasitic nematodes during its interaction with its host, since these nematodes establish their SFS inside the vascular cylinder, where there is an abundant deposition of polymers for the formation of secondary walls and a high lignification of roots.

On the other hand Wuyts *et al.* (2007) point out that it is possible for the pathway of phenylpropanoids to be redirected towards the synthesis of compounds related to resistance. In this way, the hydroxycinnamic acids covalently bonded to the polysaccharides of the CW constitute a possible second physical (and chemical) barrier to the nutrition and migration of the nematodes in the cortex of the roots. Given the physiological importance of the products in the pathway of the phenylpropanoids in the plant-sedentary endoparasitic nematode, the pathway seems to be directed, in the new CW synthesis, towards the

do *M. incognita* fuera menor en comparación con las plantas silvestres (Wuyts et al., 2006). Posiblemente el incremento de lignina S en los haces vasculares, impidió el flujo de nutrientes hacia las células gigantes o que los nematodos se alimentaran de las células gigantes (Wuyts et al., 2006). De manera similar cuando el contenido de unidades S se redujo en 10 %, en plantas de tabaco en las que se bloqueó la expresión de la enzima isoflavona O-metiltransferasa (OMT), disminuyó el tiempo en que *M. incognita* completó su ciclo de vida y hubo un mayor número de juveniles en comparación con las plantas en las que no se bloqueó al gen OMT (Wuyts et al., 2006). En contraste con lo anterior, Quentin et al. (2009) encontraron que en plantas de *A. thaliana* en las que el nivel de lignina S se redujo debido al bloqueo de la actividad de la enzima COMT, el desarrollo del nematodo y el tiempo que le llevó completar su ciclo de vida fue similar al observado en plantas testigo, en las que no se bloqueó a la enzima; esto es, la reducción del sirigil no agregó ni positiva ni negativamente el establecimiento del nematodo. Se menciona que *A. thaliana* es por naturaleza susceptible a *M. incognita*, lo que podría explicar porque en este caso las diferencias en el contenido de los monómeros de lignina (G o S) en los tejidos de la planta, no influyó en la infección y ciclo de vida del nematodo. Sin embargo, puede ser que en otras plantas modificaciones en la actividad de la enzima COMT determinen el tipo de interacción (compatibilidad o incompatibilidad) (Pegard et al., 2005).

Con base en las investigaciones referidas se infiere que es muy probable que el tipo y predominancia de los monolignoles que forman a la lignina, específicamente el tipo de unidad monomérica (S, G o H) depositada, puede influir en la infección y reproducción de los nematodos endoparásitos sedentarios durante su interacción con su hospedante, ya que estos nematodos establecen sus SEA dentro

de formación de los monómeros que forman un tipo de lignina que favorece la formación de SFS funcionales. Como se opone a lo que ocurre en las incompatibles, la vía está dirigida hacia la biosíntesis de lignina, que es una barrera para la defensa física y los metabolitos secundarios con propiedades antimicrobiales.

CONCLUSIONS

The changes that take place in plant cells as a result of the reprogramming of the genetic expression induced by the nematode in the root of its host are perfectly coordinated and synchronized. Metabolic, physiological, and structural alterations also include the modification of the components of the plant's CW. Lignin is more frequently conceived as a potential physical barrier against pathogens. In the plant-sedentary endoparasitic nematode interaction, its biosynthesis, deposition, and composition are a part of the modifications involved in the restructuring of the cell walls of the host's roots. This process is crucial for the formation of the specialized functional nutrition site, which will allow the nematode to complete its life cycle. In the particular case of lignin, the nematode modifies the abundance and disposition of the monolignols that compose it, and depending on the dialog that takes place between plant and nematode (compatible or incompatible interaction) the lignin will contribute to the creation of a favorable environment for the successful establishment of the nematode or an environment that hinders its growth and life cycle completion. The potential of nematodes is well-known for modifying important metabolic pathways during its interaction with its host, such as the pathway of phenylpropanoids. However, given the complexity of the pathway, due, on one hand, to the existence of multiple

del cilindro vascular, sitio en el que ocurre abundante deposición de polímeros para la formación de paredes secundarias y alta lignificación de raíces.

Por otro lado Wuyts *et al.* (2007) señalan que es posible que la ruta de los fenilpropanoides se redireccione hacia la síntesis de compuestos relacionados con la resistencia. Así los ácidos hidroxiciánicos unidos covalentemente a los polisacáridos de la PC, constituyen una posible segunda barrera física (y química) para la alimentación y migración de los nematodos en el cortex de las raíces. Dada la importancia fisiológica de los productos de la ruta de los fenilpropanoides, en las interacciones planta-nematodos endoparásitos sedentarios, la ruta parece ser dirigida, durante la síntesis nueva de PC, hacia la formación de los monómeros que forman un tipo de lignina que favorece la formación de SEA funcionales. En contraste en las incompatibles, la ruta se dirige hacia la biosíntesis de lignina que constituye una barrera física de defensa y de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas.

CONCLUSIONES

Los cambios que se suscitan en las células vegetales, resultado de la reprogramación de la expresión génica inducida por el nematodo en la raíz de su hospedante, están perfectamente coordinados y sincronizados; las alteraciones metabólicas, fisiológicas y estructurales también incluyen la modificación de los componentes de la PC vegetal. Con más frecuencia se concibe a la lignina como una barrera física potencial contra la invasión por fitopatógenos; en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios su biosíntesis, deposición y composición, son parte de las modificaciones involucradas en la reestructuración de las paredes de las células de la raíz del hospedante. Este

isoforms of the genes responsible for codifying the enzymes involved, and on the other hand, to the abundant variation of metabolites produced through it, it has become difficult to elucidate the behavior and function of the genes implied in the pathway during the plant-nematode interaction. The functional characterization of these genes and the explanation of the part they play in the biosynthesis and deposition of monolignols is a challenge that has begun to be tackled using techniques such as infrared spectroscopy, separation by gas chromatography (GC) and identification by mass spectrometry (MS). Likewise, molecular techniques such as hybridation with microarrangements, which helps compare the genic expression of a set of genes in different conditions, and the availability of new sequencing equipment can contribute to the identification and characterization of the isoforms implied in the biosynthesis of monolignols. In this way, it will be possible to know more about the role played by lignin in the plant-nematode interactions, which could provide elements for the design of new ways to control these plant pathogens.

Acknowledgements

We would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship granted to Erika Lagunes Fortiz, as well as the Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados.

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

proceso es fundamental para la formación del sitio especializado de alimentación funcional, que le permitirá al nematodo completar su ciclo de vida. En el caso particular de la lignina, el nema-

todo modifica la abundancia y disposición de los monolignoles que la integran, y dependiendo del diálogo que se establezca entre el nematodo y la planta (interacción compatible o incompatible) la lignina contribuirá a la creación de un medio favorable para el establecimiento exitoso del nematodo o un ambiente que le impida desarrollarse y completar su ciclo de vida. A la fecha se tiene conocimiento del potencial que tienen los nematodos para modificar importantes rutas metabólicas durante la interacción con su hospedante, como la de los fenilpropanoides. No obstante, dada la complejidad de la ruta, debido por un lado, a la existencia de múltiples isoformas de los genes responsables de codificar a las enzimas involucradas y por el otro, a la abundante variación de metabolitos que son producidos a través de ella, ha resultado difícil elucidar el comportamiento y función de los genes implicados en la ruta durante la interacción planta-nematodo. La caracterización funcional de estos genes y el esclarecimiento del papel que juegan en la biosíntesis y deposición de monolignoles constituye un reto que se ha empezado a abordar mediante técnicas como la espectroscopía infrarroja, separación por cromatografía gaseosa (GC) e identificación por espectrometría de masa (MS); así mismo, técnicas moleculares como la hibridación con microarreglos, que permite la comparación de la expresión génica de un conjunto de genes en condiciones distintas, y la disponibilidad de nuevos equipos de secuenciación pueden contribuir a la identificación y caracterización de las isoformas implicadas en la biosíntesis de monolignoles. De esta manera se podrá avanzar en el conocimiento del papel de lignina en las interacciones planta-nematodo, mismo que podría aportar elementos para el diseño de nuevas formas de control de estos fitopatógenos.

#### Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de estudios de posgrado de la primera autora, así como al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados.

## LITERATURA CITADA

- Abad P, Castagnone-Sereno P, Rosso MN, de Almeida EJ and Favary B. 2009. Invasion, feeding and development. In: Perry RN, Moens M and Starr JL. 2009. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. pp:163-181.
- Allina SM, Pri-Hadash A, Theilmann DA, Ellis BE and Douglas CJ. 1998. 4-Coumarate: Coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiology*. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.116.2.743>
- Balbridge GD, O'Neill NR and Samac DA. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology*. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006182908528>
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Boerjan W and Baucher MR. 2003. Lignin Biosynthesis. *The Annual Review of Plant Biology*. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Bonawitz ND and Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetic*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163508>
- Boudet AM. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>
- Costa MA, Bedgar DL, Moinuddin SG, Kim KW, Cardenas CL, Cochrane FC, Shockey JM, Helms GL, Amakura Y, Takahashi H, Milhollan JK, Davin LB, Browse J and Lewis NG. 2005. Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in Arabidopsis: Syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.06.022>
- Darley CP, Forrester AM and McQueen-Mason SJ. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Molecular Biology*. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010687600670>
- Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG and Baum TJ. 2008. Parasitism proteins in nematode plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.003>
- Dixon RA and Paiva N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*.



- <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, and Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x>.
- Edens RM, Anand SC and Bolla RI. 1995. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277292>
- Ehlting J, Büttner D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE and Kombrink E. 1999. Three 4-coumarate: Coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *The Plant Journal*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00491.x>
- Ehlting J, Hamberger B, Million-Rousseau R and Werck-Reichhart D. 2006. Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-006-9025-1>
- Ehlting J, Shin, JK and Douglas CJ. 2001. Identification of 4-coumarate:Coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *The Plant Journal*. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01122.x>
- Fraser CM and Chapple C. 2011. The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. e0152. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0152>
- Gheysen G and Mitchum M G. 2011. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. 2011. *Current Opinion in Plant Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.012>
- Golinowski W, Grundler FMW and Sobczak M. 1996. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma*. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01273172>
- Grabber JH. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>
- Grunder FMW, Sobczak M and Golinowski W. 1998. Formation of cell wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *The European Journal of Plant Pathology*. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008692022279>
- Hamberger B and Hahlbrock K. 2004. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307307101>
- Hofmann J and Grundler FMW. 2006. Females and males of root parasitic cyst nematodes induce different symplasmic connections between their syncytial feeding cells and the phloem in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.006>
- Hofmann J, Banora MY, de Almeida-Engler J and Grundler FMW. 2010. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0549>
- Hoth S, Stadler R, Sauer N and Hammes UZ. 2008. Differential vascularization of nematode induced feeding sites. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803835105>
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ and Chen Z. 2010. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.157370>
- Hussey RS. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001011>
- Ithall N, Recknor J, Nettleton D, Maier T, Baum TJ and Mitchum MG. 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0510>
- Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette ML, Renou JP, Abad P and Favory B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02532.x>
- Jones MGK and Northcote DH. 1972. Nematode induced syncytium - a multinucleate transfer cell. *Journal of Cell Science* 10:789-809. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5038416>
- Li L, Cheng, XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA and Chiang VL. 2001. The Last Step of Syringyl Monolignol Biosynthesis in Angiosperms Is Regulated by a Novel Gene Encoding Sinapyl Alcohol Dehydrogenase. *The Plant Cell*. <http://dx.doi.org/10.1105/TPC.010111>
- Liu CJ. 2012. Deciphering the enigma of lignification: precursor transport, oxidation, and the topochemistry of lignin assembly. *Molecular Plant*. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssr121>
- MacDonald MJ and D’Cunha GB. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*. <http://dx.doi.org/10.1139/O07-018>
- Marita JM, Ralph J, Hatfield RD, Guo D, Chen F and Dixon RA. 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00434-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00434-X)
- Marrs KA. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.127>
- Menden B, Kohlhoff M and Moerschbacher B. 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.011>
- Mitchum MG, Hussey RS, Baum TJ, Wang X, Elling AA, Wubben M and Davis EL. 2013. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*.

- <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12323>  
Nicholson RL and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>
- Pegard A, Brizzard G, Fazari A, Soucaze O, Abad P and Djian-Caporalino C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. Phytopathology. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-0158>
- Quentin M, Allasia V, Pegard A, Allais F, Ducrot PH, Favery B, Levis C, Martinet S, Masur C, Ponchet M, Roby D, Schlaich NL, Jouanin L and Keller H. 2009. Imbalanced Lignin Biosynthesis Promotes the Sexual Reproduction of Homothallic Oomycete Pathogens. Plos Pathogens. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000264>
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Peer YV and Boerjan W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. Plant Physiology. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.026484>
- Rasmussen S and Dixon RA. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling a the entry point into the phenylpropanoid pathway. The Plant Cell. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.11.8.1537>
- Rastogi S y Dwivedi UN. 2007. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. Plant Science. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.014>
- Rodiuc N, Vieira P, Banora MY y de Almeida-Engler J. 2014. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. Frontiers in Plant Science. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00160>
- Santiago R, Barros-Rios J and Malvar RA. 2013. Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. International Journal of Molecular Sciences. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14046960>
- Sattler SE and Funnell-Harris DL. 2013. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?. Frontiers in Plant Science. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00070>
- Schopfer P. 1996. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening in vitro in maize coleoptiles. Planta. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00196879>
- Sun RC, Sun XF, Wang SQ, Zhu W y Wang XY. 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. Industrial Crops and Products. [http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00112-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00112-1)
- Turner SJ and Rowe JA. 2006. Cyst nematodes. In: Perry RN y Moens M. 2006. Plant nematology. CAB International. Wallingford, UK. Pp:91-122.
- Vance CP, Kirk TK and Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.001355>
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J and Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiology. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Vanholme R, Morreel K, Ralph J and Boerjan W. 2008. Lignin engineering. Current Opinion in Plant Biology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.005>
- Vieira P, Engler G and de Almeida Engler J. 2012. Whole mount confocal imaging of nuclei in giant feeding-cells induced by root knot nematodes in *Arabidopsis*. New Phytologist. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04175.x>
- Weng JK and Chapple C. 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. New Phytologist. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>
- Wuyts N, Lognay G, Swennen R and Waele D. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. Journal of Experimental Botany. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erl044>
- Wuyts N, Lognay G, Verscheure M, Marlier M, De Waele D and Swennen R. 2007. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.). Plant Pathology. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01607.x>

## Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms?

### Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana?

Vera Torres Armendáriz, Carlos Baudel Manjarrez Domínguez, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Campus 1. Av. Universidad S/N, Arboledas, Chihuahua, Chih. CP 31110, México; Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Cuauhtémoc. Av. Río Conchos S/N Parque Industrial. Cuauhtémoc, Chihuahua. CP 31570, México; Víctor Manuel Guerrero-Prieto, Rafael Ángel Parra-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Campus Cuauhtémoc, Chih. Av. Presa de La Amistad 2015, Cuauhtémoc, Chih. CP 31510, México; Lorena Olivia Noriega Orozco, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Guaymas. Carr. Al Varadero Nacional Km 6.6 col. Las Playitas, Guaymas, Sonora. CP 85480, México; \*Graciela Dolores Ávila-Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Periférico Francisco R. Almada Km 1, Chihuahua, Chih. CP 31453, México. \*Correspondence author: gavilaq@gmail.com

Received: July 10th, 2015

Accepted: December 4th, 2015

Torres-Armendáriz V, Manjarrez-Domínguez CB, Acosta-Muñiz CH, Guerrero-Prieto VM, Parra-Quezada RA, Noriega-Orozco LO y Ávila-Quezada GD. 2016. Interactions between *Escherichia coli* O157:H7 and food plants. Has this bacterium developed internalization mechanisms? *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 64-83.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-4](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4)

First DOI published: December 05, 2015.

Primera publicación DOI: 05 de Diciembre, 2015.

**Abstract.** Despite efforts to prevent microbial contamination, the occurrence of human pathogens in fresh fruit and vegetable is quite common. It is now known that *E. coli* O157:H7 can inhabit food plants passively. Here, we review the literature on phylloplane adhesion, survival and internalization of this bacterium, as well as some of the interaction mechanisms between it and the food plant, and other

**Resumen.** La presencia de bacterias patógenas en frutas y hortalizas es muy común a pesar de los grandes esfuerzos realizados para prevenir la contaminación microbiológica. En la actualidad, se sabe (o se conoce) que *E. coli* O157:H7 puede colonizar de forma pasiva plantas comestibles. Este trabajo presenta una revisión de literatura sobre *E. coli* y su adhesión al filoplano, supervivencia e internalización, así como mecanismos de interacción bacteria - planta. Una vez, que este patógeno, se adhiere a la superficie de la planta, puede introducirse al tejido, para después movilizarse y multiplicarse. Esta revisión ofrece una visión general de los mecanismos de interacción entre el tejido vegetal y *E. coli* O157:H7. Se considera que este patógeno ha mejorado su competencia ecológica en plantas comestibles, sin perder su virulencia para el ser hu-

associated microorganisms. This pathogen, once it has adhered to the surface of a food plant, can then enter the plant tissues, where it can migrate within them, and even multiply. This review provides an overview of the interaction mechanisms between the food plant tissues and *E. coli* O157:H7. It finds that this pathogen has improved its ecological competence in food plants without losing its virulence to humans. Also, a number of future research areas were identified.

**Additional keywords:** human pathogens on plants, bacteria adhesion and internalization, food safety.

Pathogens are found almost everywhere – in the air, in water and on all living and nonliving surfaces. Thus, the environments in which food products are produced, processed and transported can all cause cross-contamination. Some of the most common sources of microbial contamination of fresh produce are related to contaminated irrigation water (Cooley *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013) and the use of improperly treated or contaminated manure (Fletcher *et al.*, 2013; Olaimat and Holley, 2012).

The chances of bacterial contamination of fruits is high, where water and nutrients are readily available to support bacterial growth. Plants and fruit surfaces usually carry static charge or have a micro-rough texture, both factors increase bacterial contamination by facilitating bacterial adhesion and establishment (Rivera *et al.*, 2009).

*Escherichia coli* (*E. coli*) represents a diverse group of bacteria. Pathogenic-*E. coli* strains are categorised into pathotypes based on their virulence factors. Six pathotypes are commonly associated with diarrhoea and collectively referred to as diarrhoeagenic-*E. coli*. For instance, Shiga toxin-producing-*E. coli* (STEC) is also referred as Verocytotoxin-producing-*E. coli* (VTEC) or enterohaemorrhagic-*E. coli* (EHEC). This

mano. Además, se identificaron áreas de oportunidad para futuros trabajos de investigación.

**Palabras clave adicionales:** patógenos de humanos en plantas, adhesión e internalización bacteriana, inocuidad.

Los patógenos se encuentran casi en cualquier lugar – aire, agua y sobre superficies vivas e inertes. De esta manera, el ambiente en el cual los alimentos se producen, procesan y transportan puede causar contaminación cruzada. Las fuentes más comunes de contaminación microbiológica en hortalizas frescas son el agua de riego contaminada (Cooley *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013) y el uso de abono a base de estiércol no tratado adecuadamente (Fletcher *et al.*, 2013; Olaimat and Holley, 2012).

La posibilidad de contaminación bacteriana en frutas es elevada, ya que en su superficie se encuentra disponible agua y nutrientes; indispensables para su crecimiento. La superficie de plantas y frutas suelen presentar una carga estática o tienen una textura microrrugosa, incrementando ambos factores la posibilidad de contaminación bacteriana debido a que facilitan la adhesión y establecimiento de la bacteria (Rivera *et al.*, 2009).

*Escherichia coli* representa un grupo muy diverso de bacterias. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en patotipos en función del factor de virulencia. Generalmente se asocian a diarrea seis patotipos, conocidos colectivamente como *E. coli* diarreogénica. Por ejemplo, la cepa *E. coli* que produce la toxina Shiga (STEC) también se conoce como *E. coli* productora de la enzima verotoxigénica (VTEC) o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Este patotipo es uno de los más comúnmente asociados a brotes de origen alimentario.

*E. coli* O157:H7 es la cepa STEC más frecuentemente aislada en Norteamérica. También, es el

pathotype is one of the most commonly associated with foodborne outbreaks.

The pathogenic *E. coli* O157:H7 is the most commonly STEC isolated in North America. It is also the most often associated serotype to bloody diarrhoea and haemolytic uremic syndrome (HUS). It normally lives in the intestinal tract systems of animals (e.g. cattle) (Ferens and Hovde, 2011). It was first reported as a gastrointestinal pathogen in 1982 (Riley *et al.*, 1983). Since then, it has been recognized worldwide as a public health problem, causing diarrhea, haemorrhagic colitis and HUS (Wang *et al.*, 2013). The serotypes O26:H11, O111:NM and O104:H4 have recently been linked to human infections, but pathogenic *E. coli* O157:H7 has been associated with most of the major outbreaks (Bavaro, 2012, Tzschoppe *et al.*, 2012; Reineke *et al.*, 2015).

Since *E. coli* O157:H7 is ranked as an important pathogen due to the number and severity of the outbreaks it has caused, this review focuses on its ability to adhere to the phylloplane, to internalise and even to multiply in the tissues of food plants. It also proposes some potentially valuable lines for future research in this area.

## CHARACTERISTICS AND PLANT-BACTERIUM COMMUNICATION

*E. coli* O157:H7 is a facultative Gram negative rod. Colourless colonies from 2-3 mm in diameter can be found when grown on sorbitol MacConkey agar (SMAC) or SMAC containing cefixime and tellurite (CT-SMAC). *E. coli* O157 is motile and possesses the flagellar antigen H7. VTEC O157 is probably the most highly infective *E. coli*; showing an infective dose of less than 15 cells (Teunis *et al.*, 2008). The infective dose for EPEC strains is  $2.3 \times 10^6$  (Donnenberg *et al.*, 1998) and for Enterotoxigenic-*E. coli* (ETEC) is  $10^9$  (Freedman *et al.*, 1998).

serotipo más frecuentemente asociado a diarrea hemorrágica y al síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). La bacteria normalmente vive en el sistema tracto intestinal de animales, particularmente en el ganado) (Ferens y Hovde, 2011). Esta bacteria fue reportada por primera vez como un patógeno gastrointestinal en 1982 (Riley *et al.*, 1983). Desde entonces, ha sido reconocida a nivel mundial como un problema de salud pública provocando diarrea, colitis hemorrágica y HUS (Wang *et al.*, 2013). Los serotipos O26:H11, O111:NM y O104:H4 recientemente han sido relacionado con infecciones en humanos, pero *E. coli* O157:H7 ha estado asociada a la mayoría de los grandes brotes (Bavaro, 2012, Tzschoppe *et al.*, 2012; Reineke *et al.*, 2015).

Puesto que *E. coli* O157: H7 está clasificada como un patógeno importante debido a la cantidad y severidad de los brotes a los que se le ha asociado, esta revisión se centra en su capacidad para adherirse al filoplano, interiorizar e incluso desarrrollarse en el tejido de las plantas. Además de proponer algunas líneas potenciales para futuras investigaciones en este campo.

## CARACTERÍSTICAS Y COMUNICACIÓN PLANTA-BACTERIA

*E. coli* O157:H7 es un bacilo facultativo Gram negativo, presenta colonias hialinas de 2-3 mm de diámetro en agar MacConkey sorbitol (SMAC) o SMAC adicionado con cefixima y telurito (CT-SMAC). Es una bacteria móvil que posee un antígeno flagelar (H7). VTEC O157 es probablemente la *E. coli* más infecciosa; con una dosis infectiva de menos de 15 células (Teunis *et al.*, 2008). La dosis infectiva para las cepas enteropatogénica es  $2.3 \times 10^6$  (Donnenberg *et al.*, 1998) y para la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es de  $10^9$  (Freedman *et al.*, 1998).

*E. coli* O157:H7 carries a number of virulence factors including a pathogenicity island, the locus of enterocyte effacement (LEE) that encodes gene regulators (Deng *et al.*, 2004), adhesin, intimin (Lai *et al.*, 2013), a type III secretion system (T3SS) (Kessler *et al.*, 2015), chaperones and several secreted proteins as the translocated intimin receptor Tir (Lai *et al.*, 2013).

It is well known that bacteria can communicate by chemical signals, to detect cell density and coordinate gene expression (Hughes and Sperandio, 2008). This process is called quorum sensing (QS). *E. coli* O157:H7 also may use QS signaling to communicate with plants, to regulate the expression of virulence and flagellar genes (Carey *et al.*, 2009).

Cell-to-cell signaling between this bacterium and its host, are regulated by acylhomoserine lactones (AHLs) (Hughes and Sperandio, 2008). In addition, AHLs are involved in biofilm formation and motility (Carey *et al.*, 2009).

## **BACTERIAL ATTACHMENT, ADHESION AND SURVIVAL ON PLANTS**

The first step of a bacterial infection in a plant tissue is phylloplane adhesion. Although, the presence and survival of pathogenic bacteria on leaves or fruit can be influenced by surface roughness and trichomes, environment conditions are also key to modulating bacterial community structures (Wan-Ying *et al.*, 2015).

Environmental factors affecting bacterial behaviour and survival time on fresh produce are: temperature, pH, relative humidity and the presence of liquid water. These can be decisive for microbial activation and growth.

Additional factors relating to the ability of the bacteria to bind and proliferate in the plant are the motility on the phyllosphere, the pathogen's

La bacteria *E. coli* O157: H7 posee varios factores de virulencia como la isla de patogenicidad, el locus de eliminación del enterocito (LEE) que codifica genes reguladores (Deng *et al.*, 2004), adhesina, intimina (Lai *et al.*, 2013), un sistema de secreción de tipo III (SST3) (Kessler *et al.*, 2015), chaperones y varias proteínas secretadas como el receptor de intimina translocado Tir (Lai *et al.*, 2013).

Es conocido que las bacterias pueden comunicarse por medio de señales químicas para detectar la densidad celular y coordinar la expresión de genes (Hughes y Sperandio, 2008) Este proceso es conocido como detección del quórum (QS). *E. coli* O157:H7 utiliza las señales del QS para comunicarse con las plantas, y para regular la expresión de genes de virulencia y genes flagelares (Carey *et al.*, 2009).

Las señales célula-célula entre la bacteria y su hospedero, están reguladas por acilhomoserin lactonas (AHLs) (Hughes y Sperandio, 2008). Además, las AHLs están involucradas en la formación de biopelículas y en la movilidad (Carey *et al.*, 2009).

## **ADHESIÓN BACTERIANA Y SOBREVIVENCIA EN LAS PLANTAS**

El primer paso para que ocurra una infección bacteriana en tejido vegetal es el contacto con el filoplano. La presencia y sobrevivencia de las bacterias en hojas o frutos puede ser influenciada por la rugosidad de la superficie y las tricomas, condiciones ambientales también son clave para la modulación de la estructura bacteriana (Wan-Ying *et al.*, 2015).

La temperatura, el pH, la humedad relativa y la presencia de agua líquida son factores ambientales que afectan el comportamiento y el tiempo de sobrevivencia de las bacterias en las plantas. Estos

ability to leach nutrients, and its interactions with other epiphytic (Aruscavage *et al.*, 2006) or phytopathogenic microorganisms. For example, Cooley *et al.* (2006) reported that *Wausteria paucula* can actively support and enhance the survival of *E. coli* O157:H7 in the rhizosphere and on the leaf-surface of lettuce. Similarly, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, can also support the survival of *E. coli* O157:H7 on lettuce (Aruscavage *et al.*, 2008).

The ability to attach to a plant surface is an important feature affecting bacterial establishment in plants. For instance, a study by Macarisin *et al.* (2012) showed that constituents of extracellular matrix such as curli and the polysaccharide cellulose can also be important for the attachment of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves.

According to Franz *et al.* (2007) and Xicohtencatl-Cortés *et al.* (2009), adhesion mechanisms suggest that *E. coli* uses several pathways to colonise food plants. The pathogen is well adapted to the biosphere and can reach the substomatal cavity and spongy mesophyll for survival. In a study by Prigent-Combaret *et al.* (2000), *E. coli* K-12 strains formed curli on coverslips. This enabled the bacteria to attach even to a clean glass surface.

To colonise host tissues, *E. coli* O157:H7 expresses intimin and other adhesins. Adhesins are a group of proteins involved in the attachment of *E. coli* to abiotic surfaces such as plastic or steel, and also the colonization of biological surfaces (McWilliams and Torres, 2014).

Moreover, these bacterial proteins located in the outer membrane, such as intimin and its translocated intimin receptor (Tir), are necessary for the adhesion between host cells and attaching and effacing (A/E) pathogens. Such A/E bacteria have an essential characteristic; the formation of an actin-rich pedestal for intimate attachment.

factores pueden ser decisivos para la activación microbiana y su crecimiento.

La movilidad en el filosfera, la capacidad del patógeno para lixiviar los nutrientes, y sus interacciones con otros microorganismos epifitos o fitopatógenos son factores adicionales relativos a la capacidad de las bacterias para unirse y proliferar en la planta (Aruscavage *et al.*, 2006). Por ejemplo, Cooley *et al.* (2006) reportaron que *Wausteria paucula* puede ayudar de forma activa a mejorar la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en la rizosfera y en la cutícula de la hoja de la lechuga. Del mismo modo, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, también sustenta a la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en la lechuga (Aruscavage *et al.*, 2008).

La capacidad de la bacteria para unirse a la superficie del tejido vegetal es una característica importante que influye en su establecimiento en la planta. Por ejemplo, un estudio realizado por Macarisin *et al.* (2012) mostró que los constituyentes de la matriz extracelular tales como la fimbria (curli) junto con la celulosa pueden ser importantes en la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las hojas de espinaca.

De acuerdo a los mecanismos de adhesión de *E. coli*, Franz *et al.* (2007) y Xicohtencatl-Cortés *et al.* (2009), sugieren que la bacteria utiliza varias vías para colonizar a las plantas. La bacteria patógena se adapta bien a la biosfera y puede llegar a la cavidad subestomatal y al mesófilo esponjoso para sobrevivir. En un estudio realizado por Prigent-Combaret *et al.* (2000) la cepa *E. coli* K-12 formó curli sobre cubreobjetos; lo que permitió a la bacteria unirse a una superficie limpia e inerte (vidrio).

Para colonizar los tejidos del hospedante, *E. coli* O157:H7 expresa intimina y otras adhesinas. Las adhesinas son un grupo de proteínas involucradas en la unión de *E. coli* tanto a superficies abióticas (plástico y acero), como a superficies vivas (McWilliams y Torres, 2014).

Intimin is encoded by the *eaeA* gene, it is in the outer membrane, and is one of the most important virulence factor of *E. coli* strains. It is involved in the attachment process of *E. coli* O157:H7 and was considered the only colonization factor before other adhesins, such fimbrial and afimbrial were discovered (Farfan and Torres, 2012). Intimin is regulated by the locus LEE (Kendall *et al.*, 2007). The expression of intimin can be regulated to respond to external factors such as osmolarity and pH (Torres *et al.*, 2007). In a study carried out by Carey *et al.* (2009) in lettuce, the *eaeA* gene was down-regulated during the storage period at 15°C, as compared to at 4 °C.

The type III secretion system (T3SS) is a key virulence factor encoded on large plasmids. It is a complex nanomachine that allows bacteria to secrete effector proteins across eukaryotic membranes (Cornelis, 2006). EHEC O157:H7 colonizes the leaf surface via flagella and the T3SS (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009). Similarly, Shaw *et al.* (2008) documented that *E. coli* O157:H7 present the gene to encode T3SS for the adhesion to spinach and lettuce leaves, and also EspA filaments that allow the surface attachment of bacteria.

Once bacteria adhere to a plant surface, it begins a recognition process on the plant surface. In a study by Cooley *et al.* (2003), the inoculation of *E. coli* into the soil, showed the microbe's ability to migrate up the stem and along the surface of *Arabidopsis thaliana*. At the end of this experiment, the bacterium was able to be recovered from leaves and flowers. This indicates that *E. coli* can easily migrate along the whole surface plant under controlled conditions. However, some researchers suggest that pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7 can survive for short periods on the plant surface and may even move into the tissues (Erickson, 2012).

Continuous exposure to stress, may enable

Por otra parte, estas proteínas bacterianas localizadas en la membrana externa, como intimina y su receptor traslocado intimina (Tir), son necesarias para la adhesión entre la célula hospedera y *E. coli* para producir la lesión de “adhesión y borrado” (A/E). Estas bacterias A/E tienen una característica esencial; la formación de un pedestal rico en actina que le confiere la habilidad para mantener una estrecha unión. La intimina es codificada por el gen *eaeA*, de la membrana externa y es uno de los factores de virulencia más importante de *E. coli*. La intimina está implicada en el proceso de fijación de *E. coli* O157:H7 y por mucho tiempo fue considerada el único factor de colonización, antes de descubrir otras adhesinas como las fimbriales y afimbriales (Farfán y Torres, 2012). La intimina se regula por el locus LEE (Kendall *et al.*, 2007). Su expresión se puede regular con el fin de responder a factores externos como la osmolaridad y pH (Torres *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Carey *et al.* (2009) en lechuga, la regulación del gen *eaeA* de *E. coli* O157:H7 se redujo durante el almacenamiento a 15 °C, en comparación con el almacenamiento a 4 °C.

El sistema de secreción tipo III (SST3) es un factor de virulencia clave codificado en plásmidos grandes. Es una compleja nanomaquinaria que les permite a las bacterias secretar proteínas efectoras a través de la membrana de las células eucariotas (Cornelis, 2006). Así, ECEH O157:H7 coloniza la superficie de la hoja mediante sus flagelos y el SST3 (Xicohtencatl-Cortés *et al.*, 2009). También, Shaw *et al.* (2008) documentó que *E. coli* O157:H7 presenta el gen que codifica para T3SS propiciando su adhesión en hojas de espinaca y lechuga, así como los filamentos EspA que le permiten a la bacteria unirse a la cutícula vegetal.

Una vez que las bacterias se adhieren a una planta, inicia un proceso de reconocimiento en la superficie de la misma. Un estudio realizado por Cooley



bacteria to survive under such conditions and may also enhance their tolerance to these conditions. Carey *et al.*, (2009) reported that *rpoS*, the gene encoding for sigma S an alternative signal factor for stress response; and *sodB* Superoxide encoding for iron superoxide dismutase B, were up-regulated at 4 °C and down-regulated after prolonged storage at 15 °C, when bacteria were inoculated into lettuce. Many genes are under *rpoS* control and are involved with stress factors, such as to pH, temperature, or oxidative stresses (Dodd and Aldsworth, 2002).

Ultra violet (UV) radiation is one of the major factors limiting bacterial survival in the phyllosphere. Nevertheless, *E. coli* possess the gene *rulAB* (resistance to UV radiation) (Brandl, 2006), which has been reported to confer DNA repair capabilities and increases UV tolerance (Feil *et al.*, 2005). Therefore, *E. coli* has the ability of withstand UV radiation.

On the other hand, biofilms are well-organised, structured communities of surface-associated cells enclosed in a polymer matrix that contains open water channels (Donlan and Costerton, 2002). Biofilms were first described in the late 1600s by Antonie van Leeuwenhoek (Donlan and Costerton, 2002). When Leeuwenhoek used acetic acid to destroy the dental plaque on his dentures; he noticed that only the free-swimming cells were killed. Till recently (c. 30 y ago), these early findings of microbial communities has been largely ignored, giving more attention to the bacteria itself.

Pathogens in biofilms live in a self-produced matrix. This matrix, integrated by polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids (Flemming and Wingender, 2010) allows bacteria to withstand long periods on plant surfaces and to be highly resistant to antimicrobial agents. Biofilm, by its nature, can be a source of secondary contamination which can shelter human pathogens, plant pathogens and symbionts. Thus, biofilm is a basic component of

*et al.* (2003), demostró la capacidad de *E. coli* para migrar desde el suelo inoculado con el patógeno hacia el tallo y superficies de *Arabidopsis thaliana*. En este experimento, después de un tiempo la bacteria pudo ser aislada de hojas y flores. Esto indica que la bacteria puede moverse con facilidad en toda la superficie de la planta bajo condiciones controladas. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir por períodos cortos de tiempo en la superficie de la planta y podría pasar al tejido (Erickson, 2012).

La exposición a condiciones de estrés permite a las bacterias sobrevivir bajo estas condiciones, e incluso mejorar su tolerancia. Carey *et al.*, (2009) reportó que *rpoS*, que codifica para el factor sigma S relacionado con la respuesta al estrés en la fase estacionaria; y *sodB* (gen que codifica para la superóxido dismutasa B) fueron regulados positivamente a 4 °C y negativamente después de almacenamiento prolongado a 15 °C, cuando las bacterias se inocularon en lechuga. Muchos genes son controlados por *rpoS* y están relacionados con la resistencia a factores de estrés, tales como el pH, la temperatura o estrés oxidativo (Dodd y Aldsworth, 2002).

La radiación ultravioleta (UV) es uno de los principales factores que limitan la sobrevivencia de la bacteria en la filósfera. No obstante, *E. coli* posee el gen *rulAB* que le confiere resistencia a la radiación UV (Brandl, 2006), el cual confiere a la bacteria la capacidad para reparar DNA y para aumentar su tolerancia a los rayos UV (Feil *et al.*, 2005). Por lo tanto, *E. coli* tiene la capacidad de soportar la radiación UV.

Por otra parte, las biopelículas son comunidades bien estructuradas y organizados de células asociadas a la superficie dentro de una matriz de polímeros que contiene canales de agua abiertos (Donlan y Costerton, 2002). Las biopelículas fueron descri-

many plant-microbe interactions.

*E. coli* has several mechanisms related to adhesion that allows it to attach to surfaces, which are well documented. However, much is still unknown about the pathogen's signaling and recognition mechanisms that allow it to establish and survive in non-host organisms. Further, it remains unclear how it can attach to abiotic surfaces such as steel, glass and polystyrene.

## INTERACTION AND INTERNALIZATION IN PLANTS

Saldaña *et al.* (2011) reported that *E. coli* O157:H7 uses a specific T3SS effector to open the stomatal guard cells of spinach leaves. This action allows internalization of the bacterium in plant tissues.

Other studies have demonstrated that *E. coli* O157:H7 can internalize within the seeds and roots, and then migrate to other tissues (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). The movement can be upwards from the roots to the lettuce foliage, as was shown in an experiment carried out by Solomon *et al.* (2002). In this experiment, the soil contained contaminated manure, and after two days, the bacterium was isolated from the edible lettuce leaf tissue.

The introduction of this human pathogen at early stages of plant development has been documented by Jablasone *et al.* (2005). They reported that *E. coli* O157:H7 was internalized in seedlings. They also suggested that this bacterium preferentially colonizes the root junctions. Since root junctions are sites that release exudates, they are potential gateway to start the bacteria internalization process. Lugtenberg *et al.* (2001) suggested that bacterial cell may have greater access to nutrients at root junctions, than those located more distantly, and therefore, when bacteria persist on plants, these facilitate internalization in developing seedlings.

tas por primera vez a finales de 1600 por Anton van Leeuwenhoek (Donlan y Costerton, 2002). Cuando Leeuwenhoek utilizó ácido acético para destruir la placa dental en su dentadura, observó que sólo murieron las bacterias que se movían libremente. Hasta hace relativamente poco tiempo (últimos 30 años) se le prestó mayor importancia a aquellos primeros hallazgos sobre comunidades bacterianas que habían sido ignorados, poniendo mayor atención a las propias bacterias.

En una biopelícula, los patógenos viven dentro de una matriz autoproducida. Esta matriz formada por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming y Wingender, 2010) permite que las bacterias resistan durante períodos prolongados en la superficie de plantas, y les confiere una alta resistencia a agentes antimicrobianos. Las biopelículas por su naturaleza, pueden ser una fuente de contaminación secundaria, la cual puede albergar bacterias patógenas a plantas, a humanos así como simbioses. Por lo tanto, las biopelículas son un componente básico para muchas interacciones planta-microorganismo.

*E. coli* presenta mecanismos bien documentados relacionados con la adhesión que le permiten unirse a las superficies. Sin embargo, aún hay mucho por estudiar acerca de los mecanismos de señalización y reconocimiento que le permiten al patógeno establecerse y sobrevivir en organismos no hospedantes. Además, aún no está claro cómo este patógeno logra adherirse a superficies abióticas como el acero, vidrio y poliestireno.

## INTERACCIÓN E INTERNALIZACIÓN EN PLANTAS

Saldaña *et al.* (2011) reportan que *E. coli* O157:H7 utiliza el sistema de secreción tipo III, efector específico T3SS, para abrir las células guarda de los estomas de hojas de espinaca. Esta acción

Several studies have shown that *E. coli* O157:H7 is able to enter by natural openings in the plant surface, such as the sub-stomatal cavities in leaves (Brandl, 2008; Erickson, 2012; Kroupitski *et al.*, 2009). Once the bacteria are inside the plant, following closure of the guard cells, they are protected from most superficial sanitisers (Gomes *et al.*, 2009). Hence, special health risks are created when a human pathogen is able to enter the plant tissues (Deering *et al.*, 2012; Warriner *et al.*, 2003 a, b), since it is protected from washing and from many industrial sanitisers (Burnett and Beuchat, 2000).

Bacteria are usually found in low numbers on food plants but, under the right conditions, in a few hours a small number of bacteria cells can multiply to hundreds of thousands (Haas *et al.*, 2014). For instance, the population of *E. coli* O157:H7 increased exponentially after inoculation into apple fruit tissue, where an inoculum of  $2.5 \times 10^2$  CFU/wound, increased 3 log units during the first 48 h following inoculation (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Although *E. coli* O157:H7 has been found to internalize in many different plants, sometimes the bacteria do not succeed in becoming internalized. Host chemical properties, such as acidity, and oil, sugar and water contents, are relevant to the colonization and survival of such microorganisms. Nevertheless, high acidity in some fresh produce, does not necessarily affect the survival of pathogenic bacteria. Also, there are factors such as the strain or serovar of bacteria, the route of contamination, weather conditions, type of surface and the age of the plant, that together influence the probability of internalization of a human pathogenic bacterium within a plant.

#### ADAPTATION TO NEW ENVIRONMENTS

It has been proposed that genes of *Archaea*

permite la internalización de la bacteria al tejido vegetal.

Otros estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 puede internarse dentro de las semillas y raíces, y luego migrar a otros tejidos (Ávila-Quezada *et al.*, 2010). El movimiento puede ser desde las raíces hacia el follaje, como se demostró en un experimento realizado por Solomon *et al.* (2002) en lechuga. En este experimento el suelo contenía estiércol contaminado y después de dos días, la bacteria pudo ser aislada del tejido foliar de la lechuga.

La introducción de este patógeno humano en las primeras etapas de desarrollo de la planta ha sido documentado por Jablason *et al.* (2005). En este trabajo *E. coli* O157:H7 logró internarse en las plántulas. Los autores reportaron que la bacteria coloniza preferentemente las uniones de la raíz. Puesto que las uniones de raíz son sitios que liberan exudados, se convierten en posibles puertas para que las bacterias inicien el proceso de internalización. Lugtenberg *et al.* (2001) sugiere que en las zonas de unión en la raíz, las bacterias pueden tener más acceso a los nutrientes que otros sitios, y por lo tanto cuando las bacterias se mantienen por un largo periodo sobre las plantas, las posibilidades de ingresar a la plántula en desarrollo incrementan.

Muchos estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 es capaz de entrar por las aberturas naturales en la epidermis de la planta, tales como las cavidades sub-estomatales de las hojas (Brandl, 2008; Erickson, 2012; Kroupitski *et al.*, 2009). Una vez que las bacterias se encuentran dentro de la planta, y las células de guarda se cierran, las bacterias quedan protegidas de la mayoría de los sanitizantes superficiales (Gomes *et al.*, 2009). Por lo tanto, mientras un patógeno posee la capacidad de entrar en los tejidos vegetales, los riesgos a la salud humana están latentes (Deering *et al.*, 2012; Warriner *et al.*, 2003a, b) puesto que el patógeno está protegido del proceso de lavado y de muchos desinfectantes industriales (Burnett and Beuchat, 2000).

species are present in the genome of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 (Faguy, 2003) which may confer a range of capabilities for adaptation to new environments. Genes of the core genome such as the metabolic genes can be transferred and can improve fitness of the strain under certain environmental conditions. For instance, a few strains of *E. coli* can ferment glucose and the acquisition of these genes can improve its adaptation to a new environment (van-Overbeek *et al.*, 2014).

A study by Szmolka and Nagy (2013) suggested that human pathogens may also acquire genes from other plant-associated bacterial species. This situation leads to new phenotypes of increased persistence in plants and broadens the utilization spectra of nutrients available on plants (van-Overbeek *et al.*, 2014). The appearance of these new features, which are encrypted in the genome of the bacterium, help to improve its fitness in a food plant.

## OUTBREAKS

Once *E. coli* O157:H7 has been established in fruits or vegetables, it does not lose its capacity for virulence to humans. This is proven by all the incidents linked to this pathogen and associated with the consumption of contaminated fruits and vegetables (Mukhopadhyay *et al.*, 2014). This bacterium was first recognized as a human pathogen in 1982, it was linked with meat products. Over the next ten years, however, a range of food-produce associated outbreaks occurred (Rangel *et al.*, 2005).

Outbreaks caused by *E. coli* O157:H7 are more common in the western hemisphere, but are certainly not confined to this part of the world, since one of the most notable cases was in Asia in 1996 (Michino *et al.*, 1999). Here, the outbreak was caused by white radish consumption in Sakai City, Osaka, Japan,

Las bacterias se encuentran generalmente en baja concentración en las hortalizas, pero, bajo las condiciones adecuadas, en pocas horas el número de células bacterianas puede multiplicarse a cientos de miles (Haas *et al.*, 2014). Por ejemplo, la población de *E. coli* O157:H7 incrementó exponencialmente después de su inoculación en tejido de manzanas, donde el inóculo de  $2.5 \times 10^2$  UFC/herida, aumentó tres log en las primeras 48 horas después de la inoculación (Janisiewicz *et al.*, 1999).

Aunque se ha encontrado que *E. coli* O157:H7 puede internarse en diversas plantas, algunas veces la bacteria no tienen éxito al tratar de ingresar. Las propiedades químicas del hospedante, tales como la acidez y el contenido de aceite, azúcares y agua, son condicionantes para la colonización y la sobrevivencia de los microorganismos. Sin embargo, la acidez de algunas frutas y hortalizas frescas, no necesariamente afecta la sobrevivencia de las bacterias patógenas. También existen factores como el tipo de cepa o serotipo bacteriano, la ruta de contaminación, condiciones climáticas, el tipo de superficie y la edad de la planta, que en conjunto influyen en la probabilidad de internalización de los patógenos en la planta.

## ADAPTACIÓN A UN NUEVO ENTORNO

Se ha descrito que los genes de especies *Archaea* están presentes en el genoma de *E. coli* O157:H7 cepa EDL933 (Faguy, 2003), los cuales pueden conferir a la bacteria gran variedad de capacidades de adaptación a nuevos ambientes. Los genes nucleares como son los genes metabólicos pueden ser transferidos y mejorar la condición de la cepa bajo ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, pocas cepas de *E. coli* tiene la capacidad de fermentar glucosa, y la adquisición de estos genes puede mejorar la adaptación a nuevos ambiente (van-Overbeek *et al.*, 2014).

where more than 6000 schoolchildren were affected (Watanabe *et al.*, 1996). Approximately 1000 of them were hospitalised with severe gastrointestinal symptoms, and about 100 had complications of HUS (haemolytic uraemic syndrome), which resulted in three deaths.

Many outbreaks have been reported in the United States (US), Canada and Great Britain. Fresh-produce associated outbreaks in the US are now one of the main vehicles linked to *E. coli* O157:H7, and represent 34 % of all foodborne outbreaks (Rangel *et al.*, 2005).

A multi-state outbreak caused by packaged spinach occurred in 2006. It affected people of 26 States in the US and resulted in 183 confirmed infections and three deaths (Center for Disease Control and Prevention, 2006). The same year, epidemiological studies detected EHEC in spinach (Center for Disease Control and Prevention, 2006).

More recently, the Center for Disease Control and Prevention (2014) reported a four State outbreak of *E. coli* STEC O157:H7 infections linked to ready-to-eat salads, where 33 persons were infected, no deaths were reported. Therefore, in the past 25 years many outbreaks have been associated with the presence of this pathogen on the surface or internalized in food plants and fruits. Based on the above, it is reasonable to ask if this human pathogen has always possessed such an intrinsic ability to extend its life in the environment (soil, water, plant) without losing its human pathogenicity, or has this capacity been developed more recently?

## SOURCES OF CONTAMINATION

Reports identify manure as the major source of contamination in the field, followed by untreated irrigation water (Aruscavage *et al.*, 2006; Castro-Ibáñez *et al.*, 2015; Ceuppens *et al.*, 2015; de

Un estudio realizado por Szmolka y Nagy (2013) sugiere que los patógenos de humanos pueden adquirir genes de otras especies bacterianas asociadas a plantas. Esta situación permite a nuevos fenotipos incrementar su persistencia en plantas y amplía el espectro de utilización de nutrientes disponibles en las plantas (van-Overbeek *et al.*, 2014). La aparición de nuevas características encriptadas en el genoma bacteriano, le ayudan a mejorar su condición física cuando se encuentran en frutas y hortalizas.

## BROTOS

Cuando *E. coli* O157:H7 se establece sobre frutas u hortalizas, no pierde su capacidad de ser virulenta a humanos. Esto se demuestra por todos los incidentes de este patógeno, asociados con el consumo de frutas y hortalizas contaminadas (Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Esta bacteria fue reconocida por primera vez como un patógeno humano en 1982, asociada con productos cárnicos. Pero, en los siguientes diez años, ocurrieron casos asociados a una gran variedad de productos comestibles (Rangel *et al.*, 2005).

Los brotes causadas por *E. coli* O157:H7 son más comunes en el hemisferio occidental, pero sin duda no se limitan a esta parte del mundo, ya que uno de los casos más notables se produjo en Asia en 1996 (Michino *et al.*, 1999). Este brote fue provocado por el consumo de rábano blanco en la ciudad de Sakai, Osaka, Japón, donde se vieron afectados más de 6000 niños en edad escolar (Watanabe *et al.*, 1996). Aproximadamente 1000 de ellos fueron hospitalizados con síntomas gastrointestinales graves, y alrededor de 100 presentaron complicaciones de HUS (síndrome urémico hemolítico), lo que lamentablemente resultó en tres muertes.

Muchos brotes epidemiológicos se han registrado en Estados Unidos, Canadá e Inglaterra. En Estados Unidos son las frutas y hortalizas frescas

Quadros *et al.*, 2014; Erickson *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012). Manure used as organic fertilizer can significantly increase total coliform contamination as well as increasing the presence of *E. coli* (de Quadros *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2006). Pathogens such as *E. coli* (VTEC) O157:H7 and pathotypes of diarrhoeagenic *E. coli* are transmitted through water and organic fertilisers (Oliveira *et al.*, 2012).

Several studies have pointed to flies (Talley *et al.*, 2009), arthropods, birds, wild mammals and reptiles (Wright *et al.*, 2013) as other major sources of pathogen transmission. It has been shown that if fresh produce is grown near livestock, these vectors can easily carry faecal contaminants to plants (Doyle and Erickson, 2012; Fletcher *et al.*, 2013; Wasala *et al.*, 2013). Also, flies can pick up *E. coli* O157:H7 from manure and deposit it onto the phylloplane of plants, where the bacteria can then colonise and multiply (Talley *et al.*, 2009). Despite such reports, the dissemination of this bacterium by flies to fresh produce requires further investigation, for it would seem to conflict with reports suggesting that *E. coli* O157:H7 can survive for only two to four days on a leaf surface (Wasala *et al.*, 2013). Other studies report that this pathogen can survive on the phylloplane of spinach leaves for 14 days (Mitra *et al.*, 2009). These authors also claim that leaf surface bacterial colonization can increase over time. Meanwhile, Wasala *et al.* (2013) suggest that leaf surface colonization, by the strain ATCC4388, does not increase when exposure time increases (vegetal tissue-bacteria).

On the other hand, it has been reported that the survival of *E. coli* O157:H7 in soil is inversely related to the microbial community diversity already present. Hence bacteria levels can greatly vary over time in such habitats (van Elsas *et al.*, 2011).

Many faecal contamination studies have

el principal vehículo asociado a *E. coli* O157:H7, y representan el 34 % de todos los brotes de origen alimentario (Rangel *et al.*, 2005).

Un brote multiestatal asociado a espinaca se produjo en el 2006. Este, afectó a personas de 26 estados de Estados Unidos con 183 casos confirmados y tres muertes (Center for Disease Control and Prevention, 2006). El mismo año, estudios epidemiológicos detectaron EHEC en espinacas (Center for Disease Control and Prevention, 2006).

Recientemente el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos (2014) reportó un brote de *E. coli* STEC O157:H7 en 33 personas de cuatro estados, y asociado con el consumo de ensaladas “listas para consumo” (RTE). En los últimos 25 años muchos brotes se han ligado a la presencia de este patógeno en la superficie o internalizado en hortalizas y frutas. Por lo anterior, es importante preguntarse si esta bacteria patógena de siempre ha tenido la capacidad intrínseca para extender su vida en el medioambiente (suelo, agua, planta) sin perder su patogenicidad hacia el humano, o si esta capacidad ha sido desarrollada recientemente?

## FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Muchos trabajos de investigación identifican al abono a base de estiércol como la principal fuente de contaminación en el campo, seguido por agua de riego no tratada (Aruscavage *et al.*, 2006; Castro-Ibáñez *et al.*, 2015; Ceuppens *et al.*, 2015; de Quadros *et al.*, 2014; Erickson *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012). El estiércol utilizado como abono orgánico puede aumentar significativamente los niveles de coliformes totales, así como de *E. coli* (de Quadros *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2006). También Oliveira *et al.* (2012) reportaron que patógenos como *E. coli* (VTEC) O157:H7 y patotipos de *E. coli* diarreogénicos se transmiten a través fertilizantes orgánicos y agua.

been carried out around the world. For example, recent work in South America has recorded the microbiological quality of fruits and leaf vegetables. In Venezuela pre- and post-harvest, strawberries, guavas and peaches were apparently within the permissible limits for sanitary quality (Gil *et al.*, 2011). While in Brazil faecal coliforms were detected in lettuce, but no *E. coli* O157 was found in this study of 36 samples (de Quadros *et al.*, 2014).

Studies in Mexico have shown that plant products are usually free of *E. coli*. The sampling included chipotle pepper (Ávila-Quezada *et al.*, 2009), Starkinson apple, Golden Delicious apple, peach, California pepper, jalapeño pepper, Serrano pepper, saladette tomatoes, grape tomatoes and cantaloupe (Ávila-Quezada *et al.*, 2008), and habanero pepper (Lugo-Jiménez *et al.*, 2010). Moreover, Rivera *et al.* (2009) reported the presence of faecal coliforms in parsley, lettuce and radish in 36.8 % of the samples analyzed. Of these samples, 24 % were positive for *E. coli*. Muñoz *et al.* (2013) assessed faecal contamination in cabbage, lettuce and spinach, vegetables which are commonly involved in *E. coli* outbreaks. They found that cabbage and spinach were the most contaminated vegetables, and these often exceeded the regulatory limits for faecal coliforms.

The presence of faecal coliforms, without the identification of *E. coli*, suggests this indicator is not always carrying this bacterium, or not been detected due to its ability to enter in a dormant state (van Elsas *et al.*, 2011). Strictly, vegetables not eaten raw, should not be part of this pathogen's transmission route; nevertheless, hand-to-mouth transfer during handling and food preparation is still possible. It is commonly thought, pathogens are removed by washing but it has been shown that significant numbers may remain after conventional washing and so can persist on fresh produce (Ginestrea *et al.*, 2005). Hence it is recommended,

Por otra parte, muchos estudios han encontrado que las moscas (Talley *et al.*, 2009), artrópodos, aves, mamíferos silvestres y reptiles (Wright *et al.*, 2013) son otras fuentes importantes de transmisión de patógenos. Se ha demostrado que si las hortalizas se cultivan cerca de ganado, estos vectores pueden acarrear la contaminación fecal a las plantas (Doyle y Erickson, 2012; Fletcher *et al.*, 2013; Wasala *et al.*, 2013). Además, las moscas pueden recoger *E. coli* O157:H7 del estiércol y depositarla en el filoplano de las plantas, donde puede posteriormente colonizar el tejido y multiplicarse (Talley *et al.*, 2009). A pesar de estos resultados, la diseminación de la bacteria por medio de las moscas requiere más investigación, debido a que otros autores reportan que *E. coli* O157:H7 solo puede sobrevivir de dos a cuatro días en la superficie de una hoja (Wasala *et al.*, 2013). Otros estudios reportan que este patógeno puede sobrevivir en el filoplano de hojas de espinaca durante 14 días (Mitra *et al.*, 2009). Estos autores afirman que la posibilidad de colonización bacteriana en la superficie de la hoja puede aumentar con el tiempo de exposición. Mientras que Wasala *et al.* (2013) sugieren que la probabilidad de colonización de la hoja, por la cepa ATCC4388, no se ve incrementada al aumentar el tiempo de exposición (tejido vegetal - bacteria).

Por otra parte, se ha documentado que la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 inoculada en el suelo mostró una relación inversa con la diversidad de la comunidad microbiana ya presente. Por lo tanto, la concentración de la bacteria puede variar mucho en el tiempo en este tipo de hábitat (van Elsas *et al.*, 2011).

Muchos estudios de contaminación fecal se han realizado en todo el mundo. Por ejemplo, estudios recientes en Sudamérica han registrado la calidad microbiológica de frutas y hortalizas. En un estudio en Venezuela, las fresas, guayabas y duraznos en pre y postcosecha se encontraron aparentemente dentro de los límites permisibles de calidad sani-

that harvest and handling procedures be examined throughout the supply chain (Berger *et al.*, 2010).

For food handlers, the most recurrent deficiency in sanitary practice is the lack of adequate hand-washing (Ávila-Quezada *et al.*, 2009). Furthermore, the efficacy of many disinfectants for destroying microorganisms has come into question in recent years, so their frequent use does not necessarily constitute safe practice.

When a vegetable is exposed to bacteria, they tend to stick to the surface. However, firm attachment usually takes a few hours. Only then, does attachment becomes sufficiently strong to resist conventional washing, rendering their removal more difficult. The situation can be aggravated by persistent wetness, as this allows polymer synthesis and hence biofilm formation (Avila-Quezada *et al.*, 2010; Flemming and Wingender, 2010).

## PREVENTION EFFORTS

As we have seen, the presence of *E. coli* O157:H7 in a food practically guarantees a disease outbreak. It is generally true that effective actions designed to prevent pathogen entry to fruits and vegetables, are more desirable than actions designed to remove or inactivate them. Thus, methods used to ensure food safety should be based on the adoption of Good Agricultural Practices (GAP), Good Manufacturing Practices (GMP), and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). Nevertheless, even these do not absolutely eliminate pathogen contamination.

Throughout the world, most cases of enteric disease are attributable to the consumption of contaminated food. However, the sources are not always properly identified, so often remain as mere, overstated assumptions. This is probably done by authorities to minimize public alarm. The fact that an outbreak linked to fruit or plant product

taria (Gil *et al.*, 2011). Mientras que en un estudio en Brasil con 36 muestras de lechuga se detectaron coliformes fecales, aunque no se detectó *E. coli* O157:H7 (de Quadros *et al.*, 2014).

Estudios realizados en México han demostrado que los productos vegetales están comúnmente libres de *E. coli*. Estos estudios incluyeron chile chipotle (Ávila-Quezada *et al.*, 2009), manzana Starkinson, manzana Golden Delicious, durazno, pimiento California, chile jalapeño, chile serrano, tomate saladette, tomates y melón (Ávila-Quezada *et al.*, 2008), y el chile habanero (Lugo-Jiménez *et al.*, 2010).

Por otra parte, Rivera *et al.* (2009) reportaron la presencia de coliformes fecales en perejil, lechuga y rábano en el 36.8 % de las muestras analizadas. De estas muestras, el 24 % fueron positivos para *E. coli*. Muñoz *et al.* (2013) evaluaron la contaminación fecal en repollo, lechuga y espinacas, hortalizas que habitualmente están relacionadas con los brotes de *E. coli*. Los autores encontraron que la col y la espinaca son las hortalizas más contaminadas, y estas a menudo exceden los límites reglamentarios para coliformes fecales.

La presencia de coliformes fecales, sin detectar a *E. coli* en la misma muestra, sugiere que este indicador no siempre incluye a la bacteria, o no ha sido detectada debido a su capacidad para entrar a un estado latente (van Elsas *et al.*, 2011). Definitivamente, las hortalizas que no se consumen crudas, no deberían ser parte de la ruta de transmisión de este patógeno; sin embargo, la transferencia de la mano a la boca durante la manipulación y preparación de alimentos, es una posibilidad. Generalmente se piensa que los patógenos se eliminan mediante el proceso de lavado, pero se ha demostrado que un número significativo de bacterias pueden permanecer y persistir en frutas y hortalizas después de un lavado convencional (Ginestrea *et al.*, 2005). Por lo tanto se recomienda analizar los procesos de co-



occurs indicates that the outbreak is the result of an occasional contamination event, which can be very difficult to identify if proper records are not available for traceability.

A number of antimicrobial treatments have been tried to control *E. coli* O157:H7 but, significant reductions in bacterial contamination of vegetables can be very difficult to achieve.

## FUTURE RESEARCH

A number of interesting questions arise from the above. These include: How are the bacterial effectors delivered to the inside of the non-host plant cells? What is the nature of the communication pathway between the microbe and the plant cell? How does protein regulation induce signaling and recognition?

Future work will address these questions through biological systems studies using postgenomic. This approach should allow understanding of gene and protein expression during recognition and internalization of *E. coli* in food plants. A better understanding of the interaction of this human pathogen with food plants is expected to provide important new scientific information, useful for developing new and improved strategies for minimising consumer risk.

## LITERATURE CITED

- Aruscavage D, Lee K, Miller S and LeJeune JT. 2006. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *Journal of Food Science* 71:89-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00157.x>
- Aruscavage D, Miller SA, Lewis IML, Lee KEN and LeJeune JT. 2008. Survival and dissemination of *Escherichia coli* O157: H7 on physically and biologically damaged lettuce plants. *Journal of Food Protection* 71:2384-2388. [http://www.oardc.ohio-state.edu/sallymiller/images/Food\\_Safety-Aruscavage\\_2008.pdf](http://www.oardc.ohio-state.edu/sallymiller/images/Food_Safety-Aruscavage_2008.pdf)
- Ávila-Quezada GD, Islas-Valenzuela CI, Muñoz-Márquez E and Sánchez-Chávez E. 2009. Physical and microbiological

secha y en general el manejo en toda la cadena de producción (Berger *et al.*, 2010).

La deficiencia más recurrente de las personas que manipulan los alimentos es la falta de un adecuado lavado de manos (Ávila-Quezada *et al.*, 2009). Por otra parte, la eficacia de muchos desinfectantes para destruir microorganismos ha sido cuestionada en los últimos años, por lo que su uso frecuente no necesariamente constituye una práctica segura.

Cuando una hortaliza está expuesta a bacterias, éstas tienden a unirse a la superficie de la hortaliza. Una adhesión firme generalmente toma un par de horas. Sólo entonces, la adhesión se vuelve lo suficientemente fuerte como para resistir el lavado convencional, haciendo que su remoción sea mucho más difícil. La situación puede agravarse si la humedad persiste, ya que esta condición permite la síntesis de polímeros y por lo tanto la formación de biopelículas (Ávila-Quezada *et al.*, 2010; Fleming y Wingender, 2010).

## ESFUERZOS DE PREVENCIÓN

Como ya se ha abordado, la presencia de *E. coli* O157:H7 en un alimento, prácticamente garantiza un brote de enfermedad. Las acciones diseñadas para prevenir la presencia de los patógenos en las frutas y hortalizas son más deseables que las acciones diseñadas para eliminar o inactivar a los patógenos. Por lo tanto, los métodos utilizados para garantizar la seguridad alimentaria deben basarse en la adopción de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manejo (BPM) y en un Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP). Incluso estas prácticas pueden no eliminar totalmente la contaminación microbiológica.

A nivel mundial, la mayoría de los casos de enfermedades entéricas se atribuyen al consumo de alimentos contaminados. Las fuentes de contami-

- contamination of the smoked “Chipotle” pepper during dehydration. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:225-231. <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/32-3/7a.pdf>
- Ávila-Quezada GD, Sánchez E, Gardea-Béjar AA and Acedo-Félix E. 2010. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*: survival and growth in plant tissue. *New Zealand Journal of Crop Horticultural Science* 38:47-55. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671003767834>
- Ávila-Quezada GD, Sánchez E, Muñoz E, Martínez LR y Villalobos E. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 77:129-136. <http://www.revistaphyton.fundromoraggio.org.ar/vol77/AVILA-QUE.pdf>
- Bavaro MF. 2012. *E. coli* O157: H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. *Current Gastroenterology Reports* 14:317-323. <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-012-0264-6>
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P and Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12:2385-2397. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Brandl MT. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44:367-392. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143359>
- Brandl MT. 2008. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied Environmental Microbiology* 74:5285-5289. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01073-08>
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ and Kjelleberg S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied Environmental Microbiology* 72:3916-3923. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03022-05>
- Burnett SL and Beuchat LR. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25:281-287. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000106>
- Burnett SL, Chen J and Beuchat LR. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4679-4687. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.11.4679-4687.2000>
- Carey CM, Kostrzynska M and Thompson S. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression on romaine lettuce using comparative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 77:235-242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.010>
- Castro-Ibáñez I, Gil MI, Tudela JA, Ivanek R and Allende A. 2015. Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production
- nación no siempre se identifican adecuadamente, por lo que a menudo permanecen como simples suposiciones. Algunas veces presuntamente declaradas por autoridades para minimizar una alarma pública. El hecho de que ocurra un brote vinculado al consumo de frutas o productos vegetales, indica que el brote es el resultado de un evento de contaminación ocasional, y puede ser muy difícil identificar su origen si no se cuenta con los registros adecuados que apoyen su rastreabilidad.
- Un gran número de tratamientos antimicrobianos se han probado para controlar *E. coli* O157:H7 pero, es muy difícil lograr una reducción significativa de la contaminación bacteriana en hortalizas.

## FUTUROSTRABAJOSDEINVESTIGACION

Una serie de preguntas interesantes surgen de lo antes expuesto. Estas preguntas son: ¿Cómo los efectores bacterianos son entregados al interior de las células vegetales no hospedantes?—¿Cuál es la naturaleza de la ruta de comunicación entre el microorganismo patógeno y la célula vegetal? ¿De qué manera la regulación de proteínas induce la señalización y el reconocimiento?

Trabajos futuros abordarán estas preguntas con estudios de los sistemas biológicos por medio de postgenómica. Este enfoque permitiría entender la expresión genética y proteica durante el reconocimiento y la internalización de *E. coli* en las hortalizas. Una mejor comprensión de la interacción de este patógeno humano con las plantas generará información científica útil para el desarrollo de estrategias eficaces para minimizar el riesgo a la salud de consumidor.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- of baby spinach in the southeast of Spain. *Food Microbiology* 49:173-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.004>
- Center for Disease Control and Prevention. 2006. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, September 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 55:1045-1046. <http://dx.doi.org/10.1037/e550322006-004>
- Center for Disease Control and Prevention. 2014. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads (Final Update). http://www.cdc.gov/ecoli/2013/O157H7-11-13/index.html?s_cid=cs_002
- Ceuppens S, Johannessen GS, Allende A, Tondo EC, El-Tahan F, Sampers I, Jacxsens L and Uyttendaele M. 2015. Risk factors for *Salmonella*, shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* occurrence in primary production of leafy greens and strawberries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12:9809-9831. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph120809809>
- Cooley MB, Chao D and Mandrell RE. 2006. *Escherichia coli* O157: H7 survival and growth on lettuce is altered by the presence of epiphytic bacteria. *Journal of Food Protection* 69:2329-2335. <http://naldc.nal.usda.gov/download/22497/PDF>
- Cooley MB, Chao D and Mandrell RE. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 on spinach and lettuce; environmental investigations in the Salinas region of pre-harvest contamination. *Phytopathology* 97:S138. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2007.97.7.S131>
- Cooley MB, Miller WG and Mandrell RE. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied Environmental Microbiology* 69:4915-4926. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4915-4926.2003>
- Cornelis GR. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* 4:811-825. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1526>
- de Quadros RR, Loiko MR, de Paula CMD, Hessel CT, Jacxsens L, Uyttendaele M, Bender RJ and Tondo EC. 2014. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control* 42:152-164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.043>
- Deering AJ, Mauer LJ and Pruitt RE. 2012. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International* 45:567-575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>
- Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T and Finlay BB. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:3597-3602. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400326101>
- Dodd CER and Aldsworth TG. 2002. The importance of *rpoS* in the survival of bacteria through food processing. *International Journal of Food Microbiology* 74:187-194. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00679-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00679-1)
- Donlan RM and Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
- Donnenberg MS, Tacket CO, Losonsky G, Frankel G, Nataro JP, Dougan G and Levine MM. 1998. Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge. *Infection and Immunity* 66:52-58. <http://iai.asm.org/content/66/1/52.full>
- Doyle MP and Erickson MC. 2012. Opportunities for mitigating pathogen contamination during on-farm food production. *International Journal of Food Microbiology* 152:54-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.037>
- Erickson M. 2012. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology* 3:283-310. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101211>
- Erickson MC, Webb CC, Díaz-Pérez JC, Phatak SC, Silvoy JJ, Davey L, Payton AS, Liao J, Ma L and Doyle MP. 2010. Surface and internalized *Escherichia coli* O157:H7 on field-grown spinach and lettuce treated with spray-contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 73:1023-1029. <http://205.251.124.92/NorthAmerica/Documents/SCIENCE%20BRIEFS/Food%20Safety%20Briefs%20June%202010%20Final.pdf>
- Faguy DM. 2003. Lateral gene transfer (LGT) between Archaea and *Escherichia coli* is a contributor to the emergence of novel infectious disease. *BMC Infectious Diseases* 3:13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/13/>
- Farfan MJ and Torres AG. 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity* 80:903-913. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.05907-11>
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman E, Thiel J, Malfatti S, Loper JE, Lapidus A, Detter JC, Richardson PM, Kyrpides NC, Ivanova N and Lindow SE. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11064-11069. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504930102>
- Ferens WA and Hovde CJ. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:465-487. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0673>
- Flemming HC and Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fletcher J, Leach JE, Eversole K and Tauxe R. 2013. Human pathogens on plants: Designing a multidisciplinary strategy for research. *Phytopathology* 103:306-315. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-09-12-0236-ia>
- Franz E, Visser AA, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ and Van Bruggen AH. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International Journal*

- of Food Microbiology 24:106-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.002>
- Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, Maneval DR, Nataro J and Crabb JH. 1998. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases 177:662-667. <http://dx.doi.org/10.1086/514227>
- Gil A, Morón de Salim A y Gaesrte Y. 2011. Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 30:24-28. <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v30n1/art06.pdf>
- Ginestrea M, Rincón G, Romero S, Harris B, Castellano M y Colina G. 2005. Especies de Aeromonas en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 25:229-235. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416579007>
- Gomes C, Da Silva P, Moreira RG, Castell-Pérez E, Ellis EA and Pendleton M. 2009. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. International Journal of Food Microbiology 135:238-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.026>
- Haas CN, Rose JB and Gerba CP. 2014. Quantitative Microbial Risk Assessment. Second Edition. John Wiley & Sons Publication. New York, USA. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118910030>
- Hughes DT and Sperandio V. 2008. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their host. Nature Reviews Microbiology 6:111-120. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1836>
- Jablasone J, Warriner K and Griffiths M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. International Journal of Food Microbiology 99:7-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.011>
- Janisiewicz WJ, Conway WS, Brown MW, Sapers GM, Fratamico P and Buchanan RL. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut apple tissue and its potential for transmission by fruit flies. Applied and Environmental Microbiology 65:1-5. <http://aem.asm.org/content/65/1/1.full>
- Kendall MM, Rasko DA and Sperandio V. 2007. Global effects of the cell-to-cell signalling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infection and Immunity 75:4875-4884. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00550-07>
- Kessler R, Nisa S, Hazen TH, Horneman A, Amoroso A, Rasko DA and Donnenberg MS. 2015. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. Pathogens and Disease 73:ftv076. <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftv076>
- Kroupitski Y, Golberg D, Belausov E, Pinto R, Swartzberg D, Granot D and Sela S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. Applied and Environmental Microbiology 75:6076-6086. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01084-09>
- Lai Y, Rosenshine I, Leong JM and Frankel G. 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology 15:1796-1808. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12179>
- Lugo-Jiménez N, Carballo-Bautista M, Sauri-Duch E, Centurión-Yah A y Tamayo-Canúl E. 2010. Efecto del sistema de cultivo sobre la calidad microbiológica del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) después de su cosecha. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 11:171-179. <http://www.redalyc.org/exportar/cita.oa?id=81315809009>
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L and Bloemberg GV. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. Annual Review of Phytopathology 39:461-490. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.461>
- Macarasin D, Patel J, Bauchan G, Giron JA and Sharma VK. 2012. Role of curly and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach leaves. Foodborne Pathogens and Disease 9:160-167. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1020>
- Machado DC, Maia CM, Carvalho ID, da Silva NF, Dantas MC and Andre PB. 2006. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. Brazilian Journal of Microbiology 37:538-544. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822006000400025>
- McWilliams BD and Torres AG. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. Microbiology Spectrum 2:EHEC-00032013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013
- Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A and Yanagawa H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. American Journal of Epidemiology 150:787-796. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
- Mitra R, Cuesta-Alonso E, Wayadande A, Talley J, Gilliland S and Fletcher J. 2009. Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in spinach. Journal of Food Protection 72:1521-1530. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681281>
- Mukhopadhyay R, Ukuku DO, Juneja V and Fan X. 2014. Effects of UV-C treatment on inactivation of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on grape tomato surface and stem scars, microbial loads, and quality. Food Control 44:110-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.027>
- Muñoz S, Vilca M, Ramos D and Lucas J. 2013. Frequency of enterobacteria in fresh vegetables of raw consumption sold in four markets in Lima, Peru. Revista de Investigación Veterinaria del Perú 24:300-306. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-911720130003000006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Olaimat AN and Holley RA. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiology 32:1-19. [VOLUMEN 34, NÚMERO 1, 2016](http://dx.doi.org/10.1016/j.</p>
</div>
<div data-bbox=)

- fm.2012.04.016
- Oliveira M, Viñas I, Usall J, Anguera M and Abadias M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* 156:133-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014>
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Thi TTL, Vidal O, Lejeune P and Dorel C. 2000. Development pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colonic acid. *Environmental Microbiology* 2:450-464. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM and Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11:603-609. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1104.040739>
- Reineke K, Sevenich R, Hertwig C, Janßen T, Fröhling A, Knorr D, Wieler LH and Schlüter O. 2015. Comparative study on the high pressure inactivation behavior of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 and O157: H7 outbreak strains and a non-pathogenic surrogate. *Food Microbiology* 46:184-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.017>
- Riley LW, Remis RS and Helgerson D. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308:681-685. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198303243081203>
- Rivera JM, Rodríguez C y López J. 2009. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26:45-48. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342009000100009&script=sci_arttext
- Saldaña Z, Sánchez E, Xicohtencatl-Cortés J, Puente JL and Giron JA. 2011. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology* 2:119. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00119>
- Shaw RK, Berger CN, Feys B, Knutton S, Pallen MJ and Frankel G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2908-2914. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02704-07>
- Solomon EB, Yaron S and Matthews KR. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:397-400. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.1.397-400.2002>
- Szmulka A and Nagy B. 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact in public health. *Frontiers in Microbiology* 4:258. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258>
- Talley JL, Wayadande AC, Wasala LP, Gerry AC, Fletcher J, DeSilva U and Gilliland SE. 2009. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157:H7 to spinach leaves by houseflies (Diptera: Muscidae). *Journal of Food Protection* 72:1547-1552. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681284>
- Teunis PFM, Ogden ID and Strachan NJC. 2008. Hierarchical dose response of *E. coli* O157: H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiology and Infection* 136:761-770. <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268807008771>
- Torres AG, Millflores-Flores L, García-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martínez-Laguna Y and Woodward MJ. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157: H7. *International Journal of Medical Microbiology* 297:177-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.005>
- Tzschoppe M, Martin A and Beutin L. 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 152:19-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.009>
- van Elsas JD, Semenov AV, Costa R and Trevors JT. 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal* 5:173-183. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- van-Overbeek LS, van Doorn J, Wichers JH, van Amerongen A, van Roermund HJW and Willemsen PTJ. 2014. The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *Frontiers in Microbiology* 5:104. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00104>
- Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A and Ge B. 2013. Current trends in detecting non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathogens and Disease* 10:665-677. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1448>
- Wan-Ying X, Jian-Qiang S and Yong-Guan Z. 2015. Phyllosphere bacterial community of floating macrophytes in paddy soil environments as revealed by illumine high-throughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 81:522-532. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03191-14>
- Warriner K, Ibrahim F, Dickinson M, Wright C and Waites WM. 2003a. Internalization of human pathogens within growing salad vegetables. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 20:117-134. DOI:10.1080/02648725.2003.10648040
- Warriner K, Spaniolas S, Dickinson M, Wright C and Waites WM. 2003b. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology* 95:719-727. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02037.x>
- Wasala L, Talley JL, DeSilva U, Fletcher J and Wayadande A. 2013. Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach by house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Phytopathology* 103:373-380. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-09-12-0217-FI>
- Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K and Tamura K. 1996. Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157:H7 infection by two different genotype strains. The Lancet 348:831-832. [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)65257-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)65257-9/abstract)

Wright KM, Chapman S, McGeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK and Holden NJ. 2013. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. *Phytopathology* 103:333-340. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-08-12->

0209-FI

Xicohtencatl-Cortes J, Sánchez-Chacon E, Saldana Z, Freer E and Giron JA. 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection* 72:1531-1537. iafp/jfp/2009/00000072/00000007/art00025

Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi

Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes

Claudio Rios Velasco*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Janeth M. Caro Cisneros**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **David I. Berlanga Reyes**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **María F. Ruíz Cisneros** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial Cuauhtémoc, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **José J. Ornelas Paz**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Miguel Á. Salas Marina**, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV, *Campus* Irapuato) del Instituto Politécnico Nacional, Km. 9.6 Libramiento Norte, C.P. 36821, Irapuato Guanajuato, México; **Elizabeth Villalobos Pérez**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Víctor M. Guerrero Prieto**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Corresponding author: claudio.rios@ciad.mx

Recibido: 1 de Julio, 2015.

Aceptado: 17 de Noviembre, 2015.

Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruíz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1)

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

Abstract. Several diseases in crop plants caused by pathogenic fungi represent an economic

Resumen. Muchas enfermedades en cultivos causadas por hongos patógenos representan un problema económico debido a las pérdidas que éstas causan. Del mismo modo microorganismos antagonistas tales como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., entre otros, han sido usados como agentes de control biológico como una alternativa eficiente para reducir el uso de fungicidas químicos en el control de enfermedades de plantas. El objetivo de este estudio fue identificar taxones de microorganismos patógenos y antagonistas basado en sus caracteres moleculares y evaluar la actividad antagónica *in vitro* de dos aislados de *Bacillus* y dos aislados

problem due the losses they cause. Likewise, antagonistic microorganisms have been used as biological control agents such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., among others as an efficient alternative to reduce the use of chemical fungicides in the control of crop diseases. The aim of this study was to identify the taxa of pathogens and antagonists microorganisms based on their molecular characters and to evaluate the antagonistic activity *in vitro* of two *Bacillus* isolates and two *Trichoderma* isolates, against five common pathogenic fungi: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus nidulans*, and *Alternaria alternata*. The nine microorganisms were used for the gDNA extraction and to amplify the 18S ribosomal DNA gene and the Internal Transcribed Spacer with the ITS primers ITS5 and ITS4 of fungi and gene of the 16S of the rDNA, using the universal primers EU(F) and EU(R) for bacteria, for molecular identification. Both *T. asperellum* isolates showed a significant antagonistic activity against the phytopathogenic fungi tested where the percentage of radial growth inhibition (PRGI) of the fungi colonies ranged from 43 to 71 %, whereas the PRGI induced by *Bacillus* species, were significant, with values up to 69 % when tested *in vitro* against *B. cinerea*, while the lowest effect was observed with *F. oxysporum*, *P. crustosum*, and *A. nidulans*. Both *Bacillus* species induced the presence of an inhibition halo, with values of 5 and 11 mm, when tested *in vitro* against *F. oxysporum*, and *B. cinerea*, respectively. The antagonistic effect of the bacterial and fungal isolates showed that these microorganisms could be used as biological control agents of several phytopathogenic fungi of crop plants.

Key words: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperellum*, phytopathogens, ITS region, molecular identification.

de *Trichoderma* contra cinco hongos patógenicos comunes: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus nidulans* y *Alternaria alternata*. Para la identificación molecular, los nueve microorganismos fueron usados para la extracción del ADN genómico y amplificación del gen del ADN ribosomal 18S y del Espaciador Transcrito Interno con los iniciadores ITS (ITS5 e ITS4) para los hongos y el gen del 16S del ADNr, usando los iniciadores universales EU(F) y EU(R) para bacterias. Ambos aislados de *T. asperellum* mostraron una actividad antagonista significativa contra los hongos fitopatógenos probados, donde los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) de las colonias de hongos fitopatógenos fluctuó de 43 a 71 %, mientras los PICR inducidos por *Bacillus* fueron significativos, con valores de hasta 69 % cuando se probaron *in vitro* contra *B. cinerea*, mientras que el efecto más bajo se observó con *F. oxysporum*, *P. crustosum* y *A. nidulans*. Ambas especies de *Bacillus*, indujeron la presencia de un halo de inhibición, con valores de 5 y 11 mm, cuando se probaron *in vitro* contra *F. oxysporum* y *B. cinerea*, respectivamente. Los efectos antagonistas de los aislados de bacterias y hongos, muestran que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de control biológico de varios hongos fitopatógenos de cultivos.

Palabras clave: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperellum*, fitopatógenos, región ITS, identificación molecular.

Una gran diversidad de microorganismos patógenicos tales como Oomicetos, hongos, bacterias, nematodos, entre otros, pueden causar enfermedades en cultivos, siendo un serio problema ocasionando pérdidas económicas en todo el mundo. Por consiguiente, los problemas y limitaciones del control de enfermedades en plantas, ha sido manejado mediante el uso de plaguicidas químicos.

A great diversity of pathogenic microorganisms such as Oomycetes, fungi, bacteria, nematodes, among others, can cause diseases in crop plants, being a serious problem causing economic losses worldwide. Therefore, the problems and limitations of the control of plant diseases have been handled by using chemical pesticides. Furthermore, its inappropriate use has been linked to several problems such as environmental pollution, food residues, intoxication risk when they are managed without adequate protection equipment, also resistant development of pathogens to the synthetic fungicides and the loss of the natural biodiversity in agroecosystems (Harris *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2012). This problematic has conducted to the search of new alternatives for managing plant diseases that are ecologically and economically viable, with minimal impact on the environment.

An alternative to chemical control of phytopathogenic fungi is its suppression by use of biological control agents with emphasis in the use of native antagonists (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008), being a tool that does not affect the environment. Consideration has been given to the possibility of controlling pathogens by the use of several microorganisms with antagonistic activity such as fungi, bacteria, and actinomycetes. However, the first two have been the most used, mainly *Trichoderma* and *Bacillus* genera. The most used bacteria specie has been *B. subtilis*, however there are other antagonist species such as *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens* which have been poorly studied, but have been considered as efficient colonizers that are widely spread in different habitats, due to its capacity to form spores, grow in a wide range of temperatures, antibiotic production that inhibit the growth of phytopathogens, besides being plant growth promoters (Leelasuphakul *et al.*, 2008). Both,

Además, su uso inapropiado se ha relacionado con varios problemas tales como contaminación ambiental, residuos en alimentos, también el desarrollo de resistencia a los fungicidas sintéticos por los patógenos y la pérdida de la biodiversidad natural en los agroecosistemas (Harris *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2012). Ésta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades de plantas que sean ecológica y económicamente viables, con un impacto mínimo en el ambiente.

Una alternativa al control químico de hongos fitopatogénicos es su supresión por el uso de agentes de control biológico con énfasis en el uso de antagonistas nativos (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008), siendo una herramienta que no afecta al ambiente. Se ha considerado la posibilidad de controlar patógenos por el uso de varios microorganismos con actividad antagónica tales como hongos, bacterias y actinomicetos. Sin embargo, los dos primeros han sido los más usados, principalmente los géneros *Trichoderma* y *Bacillus*. *Bacillus subtilis* ha sido la especie de bacterias más usada, sin embargo, existen otras especies de antagonistas tales como *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, las cuales han sido pobremente estudiadas, pero han sido consideradas como colonizadores eficientes que se diseminan ampliamente en diferentes hábitats, debido a su capacidad de formar esporas, su crecimiento en un amplio rango de temperaturas, producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, además de ser promotores del crecimiento vegetal (Leelasuphakul *et al.*, 2008). Ambos antagonistas, hongos y bacterias, constituyen la mayoría de la población microbiana en el suelo, que ha sido el principal reservorio natural, donde el equilibrio entre la diversidad de microorganismos es dinámico, contribuyendo en la reducción de enfermedades en plantas cultivadas y no cultivadas (Gajera and Vakharia,

antagonistic fungi and bacteria, constitute the majority of the microbial population in soil that is the main natural reservoir, where the equilibrium between the diversity of microorganism is dynamic, contributing in reducing diseases in crop plants and uncultivated plants (Gajera and Vakharia, 2010; Singh and Islam, 2010). This ecological balance is supported by different complex interactions to inhibit the growth of phytopathogenic fungi through several modes of action such as: direct competition for nutrients and space, direct mycoparasitism, production of antibiotics by the excretion of toxic compounds like cytokinins and auxins, inactivation of pathogenic enzymes, also can be compatible with management practices, including the use of pesticides, production of organic and inorganic volatile compounds. Besides its fast growth, are easily adaptable, induces systemic resistance in host plants to pathogens, and contributes to a better assimilation of nutrients (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008; Arguelles, 2009; Correa *et al.*, 2009). However, antagonistic microorganisms populations have been reduced by anthropogenic activities, especially by chemical pesticides used in the crops management (Gajera and Vakharia, 2010). Microbial control agents are commonly used for the management of bacterial and fungal diseases in crops and it is becoming more widely used, with a possible reduction in the use of synthetic pesticides. These microbial agents are generally identified based on their microscopic morphological characters. Although microorganisms can be identified based on morphologic characters, molecular techniques are nowadays widely used and in general more acceptable tools for identification that offer quick and reliable information for the study of identity (Gajera and Vakharia, 2010). Therefore the aims of this study were to identify taxa and to evaluate the antagonistic activity *in vitro* of two *Bacillus* isolates and two *Trichoderma asperellum* isolates,

2010; Singh and Islam, 2010). Este balance ecológico esta apoyado por diferentes interacciones complejas para inhibir el crecimiento de hongos fitopatogénicos a través de varios modos de acción tales como: competencia directa por nutrientes y espacio, micoparasitismo directo, producción de antibióticos por la excreción de compuestos tóxicos como citoquininas y auxinas, inactivación de enzimas patogénicas, además pueden ser compatibles con las prácticas de manejo, incluyendo el uso de plaguicidas, producción de compuestos volátiles orgánicos e inorgánicos. Además de su rápido crecimiento, son fácilmente adaptables, inducen resistencia sistémica en las plantas hospederas hacia los patógenos y contribuyen a una mejor asimilación de nutrientes (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008; Arguelles, 2009; Correa *et al.*, 2009). Sin embargo, las poblaciones de microorganismos antagonistas han sido reducidas por actividades antropogénicas, especialmente por los plaguicidas químicos usados en el manejo de cultivos (Gajera and Vakharia, 2010). Los agentes de control microbiano se utilizan comúnmente para el manejo de enfermedades bacterianas y fúngicas en cultivos y estos han comenzado a ser ampliamente utilizados, con una posible reducción en el uso de plaguicidas sintéticos. Estos agentes microbianos son identificados generalmente basado en sus caracteres morfológicos microscópicos. Aunque los microorganismos pueden ser identificados basados en sus caracteres morfológicos, las técnicas moleculares son hoy en día las más ampliamente utilizadas y en general son herramientas más aceptadas para la identificación que ofrecen información rápida y fiable para el estudio de identidad (Gajera and Vakharia, 2010). Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron identificar los taxones y evaluar la actividad antagónica *in vitro* de dos aislados de

against five common pathogenic fungi.

Experimental site and biological samples.

The experiment was performed *in vitro*, in the Laboratory of Patología Vegetal y Control Biológico of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Microorganisms used, were obtained from the microorganisms ceparium of the same *Campus*. Pathogens were isolated from fruits, diseased tissue of apple trees and soil samples near to rhizosphere, collected from different apple orchards and geographic regions of Chihuahua, México, in different periods. Also antagonists were obtained from soil samples near to rhizosphere of apple trees in the same geographic regions and were selected by their antagonistic capacity *in vitro* against Oomycetes (Rios-Velasco *et al.*, 2014). The fungi were active into potato-dextrose-agar (PDA, Bioxon™ Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) and incubated at 26 °C in an environmental chamber (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, VA, USA) for 5-10 d.

Morphological and molecular identification.

Nine microorganisms: five phytopathogenic fungi, two antagonistic fungi and two antagonistic bacteria isolates, used in this study were identified to genus with the help of taxonomic keys according to their morphological characters as viewed by an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) (Dugan, 2006; Watanabe, 2010). Subsequently, were molecularly identified in the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV, *Campus* Irapuato, Guanajuato, México.

To identify the fungal isolates based on their molecular characters, their genomic DNA (gDNA) was extracted. Thus, an explant of each purified fungus was placed and cultured in a Petri dish with

Bacillus y dos aislados de *Trichoderma asperellum*, contra cinco hongos fitopatogénicos comunes.

Sitio experimental y muestras biológicas.

El experimento se realizó *in vitro*, en el Laboratorio de Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Los microorganismos utilizados, se obtuvieron del cepario de microorganismos del mismo *Campus*. Los patógenos se aislaron de frutos y tejido enfermo de árboles de manzano y de muestras de suelo cercano a la rizosfera, recolectados de diferentes huertos de manzano y regiones geográficas de Chihuahua, México, en diferentes periodos. Así mismo, los antagonistas se obtuvieron de muestras de suelo cercano a la rizosfera de árboles de manzano en las mismas regiones geográficas y fueron seleccionados por su capacidad antagonística *in vitro* contra Oomicetos (Rios-Velasco *et al.*, 2014). Los hongos fueron activados en papa-dextrosa-agar (PDA, Bioxon^{MR} Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) e incubados a 26 °C en una cámara ambiental (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, VA, USA), por 5-10 d.

Identificación morfológica y molecular.

Nueve microorganismos: cinco aislados de hongos fitopatogénicos, dos de hongos antagonistas y dos de bacterias antagonistas, usados en este estudio, fueron identificados hasta género con la ayuda de claves taxonómicas, de acuerdo a sus caracteres morfológicos, así como observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Germany) (Dugan, 2006; Watanabe, 2010). Subsecuentemente, fueron identificados molecularmente en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV, *Campus* Irapuato, Guanajuato, México.

PDA covered with a sterile cellophane to facilitate the collection of the fungal biomass and incubated at 26 °C for 7 d. Mycelium was collected in a porcelain mortar together with a buffer [200 mM Tris-HCl at pH = 8, 250 Mm NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] for gDNA extraction filamentous fungi at 70 °C, frozen with liquid nitrogen and macerated following the protocol described by Raeder and Broda (1985). The gDNA obtained from fungi was examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel, which was used to amplify the 18S rDNA gene and the Internal Transcribed Spacer (ITS), using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') where the expected fragments were about 600 to 710 bp (White *et al.*, 1990). The amplification conditions were divided into various steps: an initial step of denaturalization at 94 °C for 5 min, a second step comprising 30 cycles including denaturalization at 94 °C of 30 s, an alignment step at 60 °C for 30 s, a step of extension at 72 °C for 45 s, and when the cycles were completed, a final extension at 72 °C for 10 min.

For the antagonistic bacteria, an explant of the purified colony of 72 h growth was taken for the gDNA extraction described by Heddi *et al.* (1999). The gDNA obtained was examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel, which was used to amplify the gene of the 16S of the rDNA by PCR, using the universal primers EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and EU(R) (5'-TACCTTGTACGACTTCACC-3'). The amplification conditions were divided into various steps: an initial of denaturalization at 94 °C for 5 min, a second step comprising 35 cycles including denaturalization at 94 °C for 30 s, an alignment step at 53 °C for 45 s, a step of extension at 72 °C for 45 s, and when the cycles were completed, a final extension at 72 °C for 10 min (Heddi *et al.*, 1999).

Para identificar los aislados de hongos por sus caracteres moleculares, se extrajo su ADN genómico (ADNg). Por lo tanto, un explante de cada hongo purificado se colocó y cultivó en una caja de Petri con PDA cubierto con celofán estéril para facilitar la recolecta de la biomasa fúngica e incubado a 26 °C por 7 d. El micelio se recolectó en un mortero de porcelana, junto con un amortiguador [200 mM Tris-HCl a pH = 8, 250 Mm NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] para la extracción de ADNg de hongos filamentosos a 70 °C, congelado con nitrógeno líquido y macerado, siguiendo el protocolo descrito por Raeder and Broda (1985). El ADNg obtenido de los hongos, fue examinado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el cual se utilizó para amplificar el gen 18S del ADN ribosomal (ADNr) y el Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés), usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), donde los fragmentos esperados fueron de aproximadamente 600 a 710 pb (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación fueron divididas en varios pasos: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, un segundo paso comprendiendo 30 ciclos, incluyendo una desnaturalización a 94 °C por 30 s, un paso de alineamiento a 60 °C por 30 s, un paso de extensión a 72 °C por 45 s y cuando se completaron los ciclos, una extensión final a 72 °C por 10 min.

Para las bacterias antagonistas, se tomó un explante de la colonia purificada de 72 h de crecimiento, para la extracción del ADNg descrita por Heddi *et al.* (1999). El ADNg obtenido, se examinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el cual se utilizó para amplificar el gen del 16S del ADNr por PCR, usando los iniciadores universales EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y EU(R) (5'-TACCTTGTACGACTTCACC-3'). Las condiciones de amplificación se dividieron en

The PCR products of both microorganisms' taxa were examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel. Subsequently, were sequenced by the company Macrogen (Rockville, Maryland, USA). Sequences obtained were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity and they corresponded to the identified species. The nucleotide sequences obtained, have not been deposited in the NCBI.

Inoculum preparation.

The inoculum was prepared by a suspension of fungal spores and bacteria, respectively, in sterile peptone-water containing sodium chloride at 0.85 % and peptone at 0.1 % into 2 mL micro tubes. The concentration of spores was estimated using a Neubauer chamber (Neubauer Improved bright-line, Marienfield, Germany) and bacteria were quantified by technique of serial dilutions and plate colony count. Both suspensions were stored at 0 °C until use. The concentration of the suspensions where the filter paper circles were immerse for the evaluation of antagonistic activity *in vitro*, ranged from 1.0×10^7 to 9.5×10^7 fungi spores or CFU-bacteria per milliliter.

***In vitro* evaluation of antagonism.**

In vitro confrontations of *T. asperellum* against pathogenic fungi were performed using the dual culture technique (Petri dishes, 90 × 15 mm) with PDA, that consisted in placing in one side of the dish a filter paper circle of 6 mm in diameter, impregnated with a suspension of conidia and mycelium as the inoculum of pathogens and in the opposite side of the Petri dish, another filter paper circle with mycelium and/or conidia of the antagonist was placed. Ten replicates for each evaluation were performed by triplicate. Also ten controls (Petri dishes) by triplicate were considered, both phytopathogens as antagonists, grown

various steps: an initial step of denaturation at 94 °C for 5 min, a second step comprising 35 cycles including a denaturation at 94 °C for 30 s, a step of alignment at 53 °C for 45 s, a step of extension at 72 °C for 45 s and when the cycles were completed, a final extension at 72 °C for 10 min (Heddi *et al.*, 1999).

Los productos de PCR de ambos taxones de microorganismos, se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Subsecuentemente, fueron secuenciados por la compañía Macrogen (Rockville, Maryland, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para verificar el porcentaje de identidad y que correspondieran a las especies identificadas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas, no han sido depositadas en el NCBI.

Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó mediante una suspensión de esporas fúngicas y bacterias, respectivamente, en agua peptonada estéril que contenía cloruro de sodio al 0.85 % y peptona al 0.1 % en microtubos de 2 mL. La concentración de esporas se estimó usando una cámara de Neubauer (Neubauer Improved bright-line, Marienfield, Alemania) y las bacterias se cuantificaron por la técnica de diluciones seriadas y conteo de colonias en placa. Ambas suspensiones se almacenaron a 0 °C hasta su uso. La concentración de la suspensiones donde los círculos de papel filtro fueron sumergidas para la evaluación de la actividad antagónica *in vitro*, fluctuó de 1.0×10^7 a 9.5×10^7 esporas de hongos o UFC-bacteria por mililitro.

Evaluación del antagonismo *In vitro*.

Las confrontaciones *in vitro* de *T. asperellum* contra hongos fitopatogénicos, se realizaron usando la técnica de cultivo dual (cajas de Petri, 90

separately. Petri dishes inoculated were incubated at 28 °C for 15 d in an environmental chamber (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, USA). The radial growth of the fungal colonies was measured every 24 h for both microorganisms pathogens and antagonists. The inhibition halo, between phytopathogen and antagonist colonies in confrontation, was measured to the cardinal points of the Petri dish at 14 d post-incubation (Aquino-Martínez *et al.*, 2008).

The time when pathogen-antagonist colonies contacted, inhibition of radial growth of the colony, and type of antagonism according to Bell's scale (Bell *et al.*, 1982) were evaluated. Where the antagonistic activity was measured by five levels, being the level one of the scale when the antagonist overgrown completely the pathogen and fills the culture surface and the level five was when the pathogen overgrown completely to the antagonist and fills the culture surface.

The antagonism of *T. asperellum* was evaluated registering the following variables: radial growth of the antagonist (RGA), radial growth of the pathogen (RGP), and percentage of radial growth inhibition (PRGI). The PRGI was determined at sixth day post-inoculation using the formula proposed by Ezziyyani *et al.* (2004), $PRGI = [(R1 - R2) / R1] \times 100$, where R1 was the radial growth of the control colony (pathogen) and R2 was the radial growth of the pathogen colony in the *in vitro* confrontation.

In vitro confrontation of *Bacillus* species against pathogens were performed by placing one filter paper circle of 6 mm in diameter of pathogen in the center of Petri dish containing PDA, whereas the bacteria were inoculated on the cardinal points of the Petri dish, using filter paper circles of 6 mm in diameter with the inoculum. Ten replicates (Petri dishes) by triplicate were performed for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation. Each of the

× 15 mm) con PDA, que consistió en colocar en un lado de la caja, un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro, impregnado con una suspensión de conidias y micelio del inóculo del patógeno y en el lado opuesto de la caja de Petri, se colocó otro círculo de papel filtro con el micelio y/o conidias del antagonista. Se realizaron diez repeticiones por triplicado para cada evaluación. También se consideraron diez testigos (cajas de Petri) por triplicado, tanto de los fitopatógenos como de los antagonistas, crecidos por separado. Las cajas de Petri inoculadas, se incubaron a 28 °C por 15 d en una cámara ambiental (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, EUA). El crecimiento radial de las colonias de hongos se midió cada 24 h para ambos microorganismos patógenos y antagonistas. El halo de inhibición, entre las colonias de fitopatógenos y antagonistas en confrontación, se midió hacia los puntos cardinales de la caja Petri a los 14 d post-incubación (Aquino-Martínez *et al.*, 2008).

Se evaluó el tiempo cuando las colonias patógeno-antagonista entraron en contacto, la inhibición del crecimiento radial de la colonia y el tipo de antagonismo de acuerdo con la escala de Bell (Bell *et al.*, 1982). Donde la actividad antagónica se midió en cinco niveles, siendo el nivel uno de la escala cuando el antagonista sobrecreció completamente al patógeno y llenó por completo la superficie del medio de cultivo, y el nivel cinco fue cuando el patógeno sobrecreció por completo al antagonista y llenó por completo la superficie del medio de cultivo. El antagonismo de *T. asperellum* se evaluó registrando las siguientes variables: crecimiento radial del antagonista (CRA), crecimiento radial del patógeno (CRP) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). El PICR se determinó al sexto día de post-incubación usando la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004), $PRGI = [(R1 - R2) / R1] \times 100$, donde R1 fue el crecimiento radial de la colonia testigo (patógeno) y R2 el

control treatments of phytopathogenic fungi was cultured separately and incubated at 28 °C for 14 d. The radial growth of the pathogen in confrontation towards the antagonist colony was measured daily and in controls the radial growth from the center of the Petri dish toward the cardinal points was measured.

Statistical analysis.

Both bioassays were performed in triplicate, with ten Petri dishes per replicate, for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation, using a completely randomized design, with five treatments: two antagonistic fungal isolates and two antagonistic bacteria isolates, confronted against five pathogens, besides 1 control, where each treatment was an antagonist microorganism with 30 Petri dishes (i.e., a total of 600). Data of PRGI and inhibition halo were analyzed using the Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002) for balanced analysis of variance (ANOVA) and means were separated by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Pathogens and antagonists identified.

The phytopathogens fungi identified morphologically and from the sequences of the PCR products were: *Fusarium oxysporum* strain LCF32, *Botrytis cinerea* strain G409, *Penicillium crustosum* strain 06CK005, *Aspergillus nidulans* strain UOA/HCPF, *Alternaria alternata* strain HMY 2-1, which had a 99-100 % of identity and a maximum similarity with the molecular scores and taxonomic keys excepting *P. crustosum*, that showed a 78 % of identity, corresponding to each strain and according to the sequences available in the GenBank database (NCBI), obtained by the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Also sequencing data showed that the fungal and bacterial antagonistic isolates identified were: *Trichoderma asperellum* TC1 strain LAHC-

crecimiento radial de la colonia del patógeno en la confrontación *in vitro*.

La confrontación *in vitro* de las especies de *Bacillus* contra patógenos se realizó colocando un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro del patógeno en el centro de la caja de Petri, que contenía PDA, mientras la bacteria se inoculó en los puntos cardinales de la caja de Petri, usando círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro con el inóculo. Se realizaron diez repeticiones (cajas de Petri) por triplicado, para cada evaluación *in vitro* bacteria-hongo. Cada uno de los los tratamientos testigo de hongos fitopatógenos se sembraron por separado, e incubados a 28 °C por 14 d. Se midió diariamente, el crecimiento radial del patógeno en la confrontación, hacia la colonia del antagonista y en los testigos se midió el crecimiento radial desde el centro de la caja de Petri hacia los puntos cardinales.

Análisis estadístico.

Ambos bioensayos se realizaron por triplicado, con diez cajas de Petri por cada repetición, para cada evaluación *in vitro* de bacteria-hongo, usando un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos: dos aislados de hongos antagonistas y dos aislados de bacterias antagonistas, confrontados contra cinco patógenos, además de 1 control, donde cada tratamiento fue un microorganismo antagonista con 30 cajas de Petri (ej., un total de 600). Los datos del PICR y halo de inhibición se analizaron usando el Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), para el análisis de varianza (ANVA) y las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Patógenos y antagonistas identificados.

Los hongos fitopatógenos identificados morfológicamente y de las secuencias de los productos de PCR fueron: *Fusarium oxysporum* cepa LCF32, *Botrytis cinerea* cepa G409, *Penicillium crustosum*

FFPK-M16- and *T. asperellum* TC2 strain BHU-BOT-RYRL16, *Bacillus methylotrophicus* strain IS04, *Bacillus amyloliquefaciens* strain Abk-2, had 99-100 % identity and maximum scores when compared with GenBank sequence, obtained from the BLAST algorithm NCBI database (Altschul *et al.*, 1990).

Antagonistic activity.

In vitro. Radial growth of the five phytopathogenic fungi tested, was significantly reduced when evaluated *in vitro* against *T. asperellum* TC1 and TC2, where both antagonists fungi showed a significant efficiency to inhibit the growth of phytopathogens fungi at 6-8 d post-evaluation (Table 1, Figure 1). Petri dishes of the controls of both *T. asperellum* isolates were completely covered by the growth of the fungi at the third day post-inoculation. Meanwhile at sixth day post-inoculation, both TC1 and TC2 isolates, came in contact with *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, and *A. alternata* except with *A. nidulans*. The highest PRGI rates were shown in *B.*

cepa 06CK005, *Aspergillus nidulans* cepa UOA/HCPF, *Alternaria alternata* cepa HMY 2-1, los cuales tuvieron un 99-100 % de identidad, excepto *P. crustosum*, que mostró un 78 % de identidad, y una máxima similitud con las máximas puntuaciones y las claves taxonómicas, correspondiendo a cada cepa y de acuerdo con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI), obtenidas por el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Así mismo, los datos de la secuenciación mostraron que los aislados de los hongos y bacterias antagonistas identificados fueron: *Trichoderma asperellum* TC1 cepa LAHC-FFPK-M16- y *Trichoderma asperellum* TC2 cepa BHU-BOT-RYRL16, *Bacillus methylotrophicus* cepa IS04, *Bacillus amyloliquefaciens* cepa Abk-2, tuvieron 99-100 % de identidad y las máximas puntuaciones, al ser comparadas con las secuencias del GenBank, obtenidas por el algoritmo de BLAST en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Actividad antagónica.

In vitro. El crecimiento radial de los cinco

Table 1. *In vitro* radial growth of phytopathogenic fungi, when inhibited by *Bacillus* species 14 d post-inoculation and by *Trichoderma* species at sixth day of incubation.

Cuadro 1. Crecimiento radial *in vitro* de hongos fitopatógenos, al ser inhibidos por especies de *Bacillus* a los 14 d post-inoculación y por especies de *Trichoderma* a los seis días de incubación.

| Phytopathogens fungi | Inhibition of pathogen (%) ± SD | | | |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>B. methylotrophicus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>T. asperellum</i> TC1 | <i>T. asperellum</i> TC2 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 42.0±7.2 b* | 51.5± 5.9 b | 52.3±2.9 d(1) | 43.3±3.5 e(1) |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 69.0±3.3 a | 63.5±4.7 a | 71.6±4.0 a(1) | 69.8±4.7 a(1) |
| <i>Penicillium crustosum</i> | 47.3±5.9 b | 41.1±3.3 d | 52.3±2.7 d(1) | 52.0±3.1 c(2) |
| <i>Alternaria alternata</i> | 66.0±7.5 a | 64.1±3.7 a | 62.0±4.1 b(1) | 56.0±2.1 b(1) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 46.7±4.3 b | 47.6±4.1 c | 58.8±4.5 c(2) | 47.2±6.6 d(2) |

*Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) / Las letras en la misma columna, indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra, no son significativamente diferentes (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Antagonistic activity was measured according to scale of Bell *et al.* (1982) where: (1) antagonist (*Trichoderma*) overgrown completely on pathogen's colony and completely covered medium's surface, and (2) antagonist (*Trichoderma*) two thirds of medium surface overgrown. SD= Standard deviation / La actividad antagónica se midió de acuerdo con la escala de Bell *et al.* (1982) donde: (1) el antagonista (*Trichoderma*) sobrecrece completamente la colonia del patógeno y cubre completamente la superficie del medio, y (2) el antagonista (*Trichoderma*) sobrecrece dos tercios de la superficie del medio. DE= Desviación estándar.

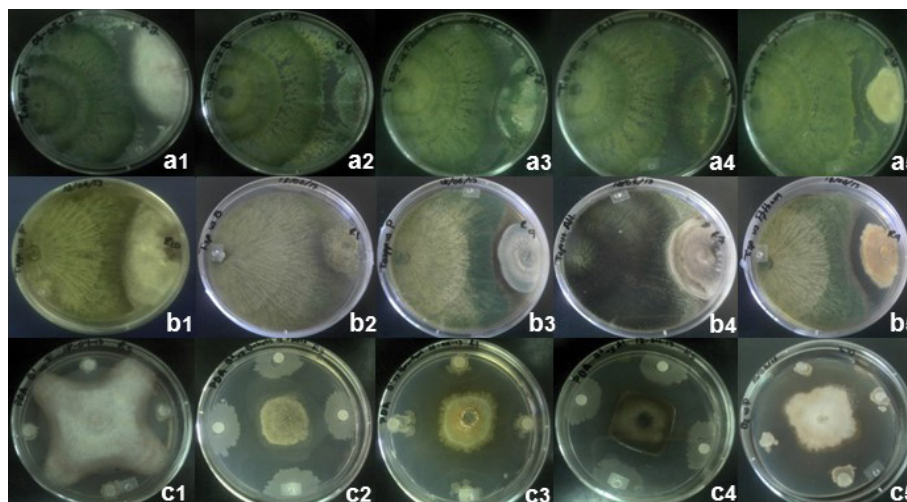


Figure 1. Mycoparasitism of *Trichoderma asperellum* TC1 (a1-a5) and *Trichoderma asperellum* TC2 (b1-b5), and inhibition halos of *Bacillus amyloliquefaciens* (c1-c5) when confronted *in vitro* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata*, and *Aspergillus nidulans*, respectively, at 14 d post-inoculation.

Figura 1. Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* TC1 (a1-a5) y *Trichoderma asperellum* TC2 (b1-b5), y halos de inhibición de *Bacillus amyloliquefaciens* (c1-c5) al ser confrontado *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus nidulans*, respectivamente, a los 14 d post-inoculación.

fabae with both *T. asperellum* TC1 and TC2 isolates with 71.6 and 69.8 %, respectively (Table 1), while the lowest rates were observed in *P. crustosum* and *F. oxysporum* with 52.3 and 43.3 %, respectively (Table 1).

In vitro evaluations against *A. nidulans*, inhibition halos of 2.6 and 4.5 mm were observed with *T. asperellum* TC1 and TC2 isolates, respectively (Table 2, Fig. 1), this may be due to the production of volatile compounds that inhibited the growth of *Trichoderma* spp., even so, both isolates were efficient to reduce the phytopathogenic fungi growth at sixth day post-inoculation (Duffy *et al.*, 2003; Harman, 2006; Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008). To respect, Cooney *et al.* (2001), mentioned that *T. harzianum* produces the antibiotic 6-pentyl- α -pyrone, which has a dual effect in inhibiting the growth of the pathogen and can also regulate genes for trichotecenes biosynthesis and micotoxines with broad spectrum antimicrobial activity. Also, Gajera and Vakharia

hongos fitopatogénicos evaluados, se redujo significativamente al ser evaluado *in vitro* contra *T. asperellum* TC1 y TC2, donde ambos hongos antagonistas mostraron una eficiencia significativa al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos a los 6-8 d post-evaluación (Cuadro 1, Figura 1). Las cajas de Petri de los testigos de ambos aislados de *T. asperellum*, fueron completamente cubiertas por el crecimiento de los hongos al tercer día de post-inoculación. Mientras tanto, al sexto día post-inoculación, ambos aislados TCI y TC2, entraron en contacto con *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, and *A. Alternata*, excepto con *A. nidulans*. Los valores más altos de PICR se mostraron en *B. fabae* con ambos aislados de *T. asperellum* TC1 y TC2 con 71.6 y 69.8 %, respectivamente (Cuadro 1), mientras que los valores más bajos se observaron en *P. crustosum* y *F. oxysporum* con 52.3 y 43.3 %, respectivamente (Cuadro 1).

En las evaluaciones *in vitro* contra *A. nidulans*, se observaron halos de inhibición de 2.6 y 4.5 mm

(2010) reported a highest inhibition of the growth of *A. niger*, caused by *T. viride* and *T. harzianum* during a study performed *in vitro*. Besides having the ability to produce wall cell degrading enzymes such as chitinase, β -1,3 glucanase, and protease in the culture medium during the *in vitro* antagonism. On the other hand, the antagonist or their purified antibiotics, can reduce the production of deoxynivalenol by >80 % and antagonistic genes are up-regulated by the presence of the pathogen (Duffy *et al.*, 2003). Therefore, the efficiency of *Trichoderma* spp. to inhibit phytopathogens fungi may have been due to their competition for space and nutrients, antibiotic production (volatile and non-volatile compounds), mycoparasitism and inactivation of the pathogen's enzymes (Ezziyani *et al.*, 2004).

In addition, an inhibition halo was observed in *T. asperellum* TC2 isolate when evaluated *in vitro* against *P. crustosum* (Table 2), this might be due to patulin production, a secondary metabolite produced by this phytopathogen (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

The growth inhibition of the pathogenic fungi colonies, induced by *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens*, was significantly different,

con los aislados de *T. asperellum* TC1 y TC2, respectivamente (Cuadro 2, Figura 1), esto puede deberse a la producción de compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de *Trichoderma* spp., aún así, ambos aislados fueron eficientes en reducir el crecimiento de los hongos fitopatógenos al sexto día de post-inoculación (Duffy *et al.*, 2003; Harman, 2006; Zeilinger and Omann, 2007; Vinaile *et al.*, 2008). Al respecto, Cooney *et al.* (2001), mencionan que *T. harzianum* produce el antibiótico 6-pentil- α -pirone, el cual tiene un efecto dual en la inhibición del crecimiento del patógeno y también puede regular los genes por la biosíntesis de tricotecenos y micotoxinas con actividad antimicrobiana de amplio espectro. Asimismo, Gajera and Vakharia (2010) reportaron una alta inhibición del crecimiento de *A. niger* causada por *T. viride* y *T. harzianum* durante un estudio realizado *in vitro*. Además de tener la habilidad para producir enzimas que degradan la pared celular tales como la quitinasa, β -1,3 glucanasa y proteasa en el medio de cultivo durante el antagonismo *in vitro*. Por otra parte, el antagonista o sus antibióticos purificados, pueden reducir la producción de deoxinivalenol por debajo del 80 % y los genes antagónicos están regulados por la presencia del patógeno (Duffy *et*

Table 2. Inhibition halo between colonies of phytopathogenic fungi and the antagonistic *Bacillus* species 14 d post-inoculation and *Trichoderma asperellum* isolates at 6 d of incubation.

Cuadro 2. Halo de inhibición entre las colonias de hongos fitopatógenos y las especies antagónicas de *Bacillus* a los 14 d post-inoculación y aislados de *Trichoderma asperellum* a los 6 d de incubación.

| Phytopathogens fungi | Inhibition halo (mm) by antagonistic \pm SD | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Bacteria | | Fungi | |
| | <i>B. methylotrophicus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>T. asperellum</i> TC1 | <i>T. asperellum</i> TC2 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 4.95 \pm 2.2 c* | 4.15 \pm 2.1 c | 0 b | 0 c |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 13.15 \pm 2.8 a | 8.45 \pm 1.3 a | 0 b | 0 c |
| <i>Penicillium crustosum</i> | 10.45 \pm 1.9 b | 6.10 \pm 1.1 b | 0 b | 2.6 \pm 1.1 b |
| <i>Alternaria alternata</i> | 12.45 \pm 3.3 a | 5.50 \pm 1.6 b | 0 b | 0 c |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 5.85 \pm 1.5 c | 7.60 \pm 1.0 a | 2.6 \pm 0.6 a | 4.5 \pm 0.9 a |

*Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). SD= Standard deviation / Las letras en la misma columna, indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra, no son significativamente diferentes (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). DE= Desviación estándar.

where the highest effect was observed in *B. cinerea* with PGRI of 69 and 63.5 %, respectively, *A. alternata* showed PGRI of 66 and 64.1 %, respectively; whereas the lowest growth reductions were registered for *F. oxysporum*, *P. crustosum*, and *A. nidulans* (Table 1). These results are similar to those obtained by Madhaiyan *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012) who found a high capacity of some strains of *Bacillus* of the same species to inhibit the growth of several phytopathogens fungi, which was due to the production of volatile compounds and antibiotics belonging to the family of iturins and subtilins, that act on the fungi's cell wall. Also, the production of hydrophilic enzymes to break down polysaccharides, nucleic acids and lipids, which are used as an energy source, might have been involved.

Bacillus amyloliquefaciens and *B. methylotrophicus* induced an inhibition halo of the pathogen colony at 14 d post-incubation (Table 2). Mean values per antagonist showed that *B. methylotrophicus* had a higher antagonistic activity than *B. amyloliquefaciens*, since the average of inhibition halo was significantly, of 4.95 to 13.15 mm and 4.15 to 8.45 mm, respectively, in the phytopathogenic fungi colonies (Table 2). The highest inhibition halos produced by *B. amyloliquefaciens* and *B. methylotrophicus* were observed with *B. cinerea* with 8.45 and 13.25 mm, respectively, whereas the lowest rates were shown against *F. oxysporum* with 4.15 and 4.95 mm, respectively (Table 2). *Bacillus methylotrophicus* showed the highest antagonistic effect against phytopathogens that may be due to the production of antibiotics and/or volatile organic compounds as hydrogen cyanide which inhibit the growth of the phytopathogenic fungi and exert harmful effects on the *in vitro* growth of several phytopathogens, these compounds can have direct or indirect effects in the activity of specific fungal enzyme (Wheatley, 2002;

al., 2003). Por lo tanto, la eficiencia de *Trichoderma* spp. para inhibir hongos fitopatógenos puede deberse a su competencia por espacio y nutrientes, producción de antibióticos (compuestos volátiles y no volátiles), micoparasitismo e inactivación de las enzimas de los patógenos (Ezziyani *et al.*, 2004).

Además, un halo de inhibición se observó en el aislado *T. asperellum* TC2 cuando se evaluó *in vitro* contra *P. crustosum* (Cuadro 2), esto puede ser debido a la producción de patulina, un metabolito secundario producido por este fitopatógeno (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

La inhibición del crecimiento de las colonias de hongos patogénicos, inducida por *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, fue significativamente diferente, donde el mayor efecto se observó en *B. cinerea* con PICRs de 69 y 63.5 %, respectivamente, *A. alternata* mostró PICRs de 66 y 64.1 %, respectivamente; donde las menores reducciones del crecimiento se registraron para *F. oxysporum*, *P. crustosum* y *A. nidulans* (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Madhaiyan *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2012) quienes encontraron una alta capacidad de algunas cepas de *Bacillus* de las mismas especies para inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos, lo cual es debido a la producción de compuestos volátiles y antibióticos pertenecientes a la familia de las iturinas y subtilinas, que actúan en la pared celular de los hongos. También, la producción de enzimas hidrofílicas para destruir los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales son usados como fuente de energía y que podrían estar involucrados.

Bacillus amyloliquefaciens y *B. methylotrophicus* indujeron un halo de inhibición de la colonia del patógeno a los 14 d post-incubación (Cuadro 2). Las medias por antagonista, mostraron que *B. methylotrophicus* tuvo mayor actividad antagónica que *B. amyloliquefaciens*, ya que el promedio de los halos de inhibición fue significativo, de 4.95 a

Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), as also reported by Madhaiyan *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012), who found that strains of *B. methylotrophicus* have a high antagonistic activity against a wide diversity of phytopathogens fungi.

According to Guillén-Cruz *et al.* (2006), *B. amyloliquefaciens* was the most efficient against *Phytophthora* spp. when evaluated *in vitro*, in addition to having an antagonistic effect and induce plant growth. To respect, Souto *et al.* (2004) mentioned that *B. amyloliquefaciens* strain added peptides and lipopeptides to the culture medium, such as fungicine, iturin, bacillomycin, among others, having antifungal properties when confronted *in vitro* against phytopathogenic fungi such as *Fusarium*, *Rhizoctonia*, and *Sclerotinia*.

Both antagonistic bacteria and fungi, significantly inhibited the *in vitro* growth of *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, *A. alternata*, and *A. nidulans*, where *B. methylotrophicus* and *T. asperellum* TC1, were the most efficient, which suggests the presence of bioactive compounds. Therefore, can be considered as viable biological control agents. So it is important to conduct more studies to identify those bioactive compounds and how they suppress the growth of the pathogens.

LITERATURE CITED

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Aquino-Martínez JG, Vázquez-García LM and Reyes-Reyes BG. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 127-137. Available online: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n2/v26n2a5.pdf>
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B and Fickers P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8: 1-12.

13.15 mm y 4.15 a 8.45 mm, respectivamente, en las colonias de hongos fitopatógenos (Cuadro 2). Los mayores halos de inhibición producidos por *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus* se observaron con *B. cinerea* con 8.45 y 13.25 mm, respectivamente (Cuadro 2). *Bacillus methylotrophicus* mostró los mayores efectos antagónicos contra fitopatógenos, que puede deberse a la producción de antibióticos y/o compuestos orgánicos volátiles como cianuro de hidrógeno, el cual inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos y ejerce efectos nocivos en el crecimiento *in vitro* de varios fitopatógenos, estos compuestos pueden tener efectos directos e indirectos en la actividad de enzimas fúngicas específicas (Wheatley, 2002; Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), así como también lo reportado por Madhaiyan *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2012), quienes encontraron que las cepas de *B. methylotrophicus* tienen una alta actividad antagónica contra una gran diversidad de hongos fitopatógenos.

De acuerdo con Guillén-Cruz *et al.* (2006), *B. amyloliquefaciens* fue el más eficiente contra *Phytophthora* spp. al ser evaluado *in vitro*, además de tener un efecto antagonista e inducir el crecimiento vegetal. Al respecto, Souto *et al.* (2004) mencionan que la cepa de *B. amyloliquefaciens* adiciona péptidos y lipopéptidos al medio de cultivo, tales como fungicina, iturina, bacilomicina, entre otros, teniendo propiedades antifúngicas al ser confrontada *in vitro* contra hongos fitopatógenos tales como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*.

Ambos antagonistas, bacterias y hongos, inhibieron significativamente el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, *A. alternata*, y *A. nidulans*, donde *B. methylotrophicus* y *T. asperellum* TC1, fueron los más eficientes, lo cual sugiere la presencia de compuestos bioactivos. Por lo tanto, pueden ser considerados como agentes de control biológico viables. Por lo que, es importante llevar a cabo más estudios para identificar esos

- <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>.
- Bell D, Well H and Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382. Available online: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF.
- Cooney JM, Lauren DR and di-Menna M.E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 522-526. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0006372>.
- Correa OS, Montecchia MS, Berti MF, Fernández-Ferrari M.C, Pucheu NL, Kerber NL and García AF. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.10.007>.
- Duffy B, Schouten A and Raaijmakers JM. 2003. Pathogen self-defense: Mechanism to counteract microbial antagonism. *Annual Review Phytopathology* 41: 501-538. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>.
- Dugan FM. 2006. The Identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 176p.
- Ezziymani M, Pérez-Sánchez C, Requena ME, Rubio L and Candela-Castillo ME. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78. Available online: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McGraw SL and Gurr SJ. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10947>.
- Gajera HP and Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274-282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.04.005>.
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E and Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 105-114. Available online: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61224204.pdf>
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>.
- Harris CA, Renfrew MJ and Woolridge MW. 2001. Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Additives & Contaminants* 18: 1124-1129. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030110050122>.
- compuestos bioactivos y la forma en que suprimen el crecimiento de los patógenos.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H and Nardon P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6814-6819. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.12.6814>.
- Leelasuphakul W, Hemmanee P and Chuenchitt S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.024>.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW and Sa TM. 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2490-2495. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.015487-0>.
- Raeder U and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rios-Velasco C, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI, Acosta-Muñiz CH, Ornelas-Paz JJ, Romo-Chacón A, Salas-Marina MA and Ibarra-Rendón JE. 2014. Enfermedades radiculares en árboles de manzano y su manejo en huertos del estado de Chihuahua. Boletín técnico generado en el proyecto 362, CIAD, A.C. Fundación Produce Chihuahua. 54p. Available online: http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anuales/anu_362-25-2014-05-1.pdf
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Singh A and Islam MN. 2010. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. *International Journal of Experimental Agriculture* 1: 20-25. Available online: [http://ggfjournals.com/assets/uploads/IJEA_20-25_\(Nazrul_vi\)_Report_soil_biol_final.pdf](http://ggfjournals.com/assets/uploads/IJEA_20-25_(Nazrul_vi)_Report_soil_biol_final.pdf)
- Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M and García AF. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL and Lorito M. 2008. A novel role of *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi.

- Morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRS Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York. 404 p.
- Wheatley R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 357-364.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1020592802234>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), pp. 315-322. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Zeilinger S and Omann M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology* 1: 227-234. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759141/pdf/grsb-2007-227.pdf>
- Zhang QL, Liu Y, Ai GM, Mia LL, Zhen HY and Liu ZP. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology* 108: 35-44.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.139>.

In vitro* Toxicity of Tropical Mexican Micromycetes on Infective Juveniles of *Meloidogyne incognita

Toxicidad *in vitro* de Micromicetos del Trópico Mexicano en Juveniles Infecciosos de *Meloidogyne incognita*

Marcela Gamboa Angulo, Jorge A. Moreno Escobar, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida CP 97200, Yucatán, México; **Elizabeth Herrera Parra**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. Km 25 Carretera antigua a Mérida-Motul, Mocochoá CP 97450, Yucatán, México; **Jaime Pérez Cruz, Jairo Cristóbal Alejo**, Instituto Tecnológico de Conkal, Km. 16.3 Antigua carretera Mérida-Motul, Conkal CP 97345 Yucatán, México; **Gabriela Heredia Abarca**, Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A.C., Km 2.5 Carretera antigua a Xalapa-Coatepec No. 351. Col. El Haya, Xalapa CP 91070, Veracruz, México. Corresponding author: jairoca54@hotmail.com

Received: July 6th, 2015

Accepted: December 10th, 2015

Gamboa-Angulo M, Moreno-Escobar JA, Herrera-Parra E, Pérez-Cruz J, Crsitobal-Alejo J y Heredia-Abarca G. *In vitro* Toxicity of Tropical Mexican Micromycetes on Infective Juveniles of *Meloidogyne incognita*. Mexican Journal of Phytopathology 34: 100-109.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-3)

First DOI published: December 11, 2015.

Primera publicación DOI: 11 de Diciembre, 2015.

Abstract. Culture filtrates and mycelia extracts (methanol and ethyl acetate) from nine selected Mexican tropical fungal strains were tested against second stage juveniles (J_2) of *Meloidogyne incognita*, *in vitro* conditions. The micromycetes *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and four unidentified strains (TA13, 2TA6, 2TA7, and 2XA7) were cultured on Czapeck-Dox medium for 14 days and mycelial mat was separated by filtration for metabolites extraction. *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 showed the highest

Resumen. Filtrados de cultivos y extractos de micelio (acetato de etilo y metanol) de nueve cepas fúngicas Mexicanas tropicales se evaluaron en condiciones *in vitro* contra juveniles de segundo estadio (J_2) de *Meloidogyne incognita*. Los micromicetos *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34 y cuatro cepas no identificadas (TA13, 2TA6, 2TA7 y 2XA7) se cultivaron en medio Czapeck-Dox durante 14 días y la masa micelial se separó por filtración para la extracción de metabolitos. *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 mostraron la mayor actividad nematóxica, tanto en filtrados de cultivo (100% de mortalidad) como en extractos metanólicos (> 90% de mortalidad). La CE_{50} más baja (0.08 mg mL⁻¹) se obtuvo con el extracto de metanol de la cepa 2XA7 no identificada. Los resultados obtenidos indican que la microbiota tropical tiene potencial como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos.

nematotoxic activity both in culture filtrates (100 % mortality) and methanol extracts (>90 % mortality). The lowest EC_{50} (0.08 mg mL⁻¹) was exhibited by the methanol extract of the unidentified strain 2XA7. The results obtained indicate that tropical mycobiota have potential as biological control agents of plant parasitic nematodes.

Key words: *Aspergillus* sp., nematotoxic, Micromycetes, root-knot nematodes, *Selenosporella* sp.

Meloidogyne incognita is one of the most important root-knot nematode in Mexican agriculture. In Yucatan affects several important crops such as habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), aloe (*Aloe vera* L.), and tomato (*Solanum lycopersicum* L.), among many others crops (Herrera-Parra *et al.*, 2011). A number of studies have reported that the metabolic production of some fungi could be used as part of management strategy (Xalxo *et al.*, 2013; Bhattacharjee and Dey 2014). These metabolites include caryospomycins (Dong *et al.*, 2007), chitinases, glucanases, peroxidases, viridine, gliotoxin, Trichodermine (Szabo *et al.*, 2013) among others.

However, there is highly necessary development more investigations on fungal potential in this topic (Hernández-Carlos and Gamboa-Angulo, 2011). In this sense, our natural products research group has focused on screening potential regional sources of eco-friendly compounds to be developed as natural nematicides to control this important nematode. As results, the *Selenosporella* sp. MR26 strain has shown to have good effectivity against *M. incognita* (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). However, in this study the nematotoxic effect detected was low (2 %), when strains were grown in fermented rice.

Also, is well documented that microbial biosynthesis of metabolites are in dependence on the substrate and conditions of culture (Shinya *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). Then, to continue the

Palabras clave: *Aspergillus* sp., nematológico, Micromycetes, nematodos agalladores, *Selenosporella* sp.

Meloidogyne incognita es el nematodo inductor de agallas en la raíz más importante en la agricultura mexicana. En Yucatán, afecta a varios cultivos importantes entre los que destacan: chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), sábila (*Aloe vera* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), entre otros (Herrera-Parra *et al.*, 2011). Numerosos estudios reportan que metabolitos secundarios producidos por algunos hongos podrían aplicarse como parte de una estrategia para su manejo (Xalxo *et al.*, 2013; Bhattacharjee y Dey 2014). Estos metabolitos incluyen caryospomycinas (Dong *et al.*, 2007), quitinasas, glucanasas, peroxidases, viridinas, gliotoxinas, trichoderminas, entre otros (Szabo *et al.*, 2013).

Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones relacionadas con el uso potencial de hongos para estos propósitos (Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2011). En este sentido, nuestro grupo de investigación de productos naturales, se ha centrado en la detección potencial de fuentes regionales de compuestos naturales para desarrollar compuestos ecológicos, con efecto nematicida para el control de este nematodo. Como resultado, la cepa *Selenosporella* sp. MR26 ha demostrado efectividad contra *M. incognita* (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio el efecto nematológico detectado disminuyó (2 %), cuando la cepa del hongo se cultivó en arroz fermentado.

Se tienen reportes que indican que la biosíntesis de metabolitos por microorganismos, están en función del sustrato y las condiciones de su cultivo (Shinya *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). Para continuar con la prospección de nuestra colección de hongos, nueve cepas seleccionadas se activaron: *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26,

Table 1. Effect of fungal culture filtrate (1 mL) and mycelium methanol extracts (0.3 mg mL⁻¹) from micromycetes strains against J₂ of *Meloidogyne incognita*.

Cuadro 1. Efecto del filtrado de cultivo fúngico (1 mL) y extractos metanólicos miceliales (0.3 mg mL⁻¹) a partir de cepas de micromicetos contra J₂ de *Meloidogyne incognita*.

| Treatment | Localities | Substrate | Mortality % | | | | | |
|---------------------------------|------------|-----------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------|-------|
| | | | Culture filtrates | | Mycelium extracts | | | |
| | | | 24 h | 48 h | Methanol | | AcOEt | |
| | | | | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h | |
| <i>Acremonium kiliense</i> TA31 | 1 | A | 27 cd | 37 b | 25 c | 35 d | 7 a | 35 b |
| <i>Aspergillus</i> sp. 2XA5 | 1 | A | 50 bc | 100 a | 52 ab | 100 a | 0 b | 0 d |
| <i>Gliocladium</i> sp. MR41 | 2 | B | 27 cd | 37 b | 27 c | 47 c | 0 b | 0 d |
| <i>Selenosporella</i> sp. MR26 | 3 | B | 50 bc | 100 a | 62 a | 90 ab | 6 a | 30 b |
| <i>Stagonospora</i> sp. TA34 | 1 | A | 60 a | 100 a | 47 ab | 86 ab | 0 b | 0 cd |
| Unidentified TA13 | 1 | A | 20 d | 100 a | NE | NE | 0 b | 0 c |
| Unidentified 2TA6 | 1 | A | 0 e | 30 b | 0 d | 32 d | 0 b | 0 d |
| Unidentified 2TA7 | 1 | A | 65 a | 100 a | 47 ab | 87 ab | 0 b | 10 c |
| Unidentified 2XA7 | 2 | A | 35 bc | 35 b | 51 ab | 100 a | 0 b | 10 c |
| Blank | - | - | 0 e | 0 c | 0 d | 0 e | 0 b | 0 d |
| Positive control | - | - | - | 100 a | - | 100 a | - | 100 a |
| Negative control | - | - | 0 e | 0 c | 0 d | 0 e | 0 b | 0 d |

Means with the same letter(s) in the column are not significantly different at $P=0.05$ according to Tukey's studentized range test. Positive control: Vydate (Oxamyl 1 mL L⁻¹). Blank: Czapeck-Dox medium/ organic extract / Medias con la misma letra (s) en la columna no son significativamente diferentes a $P=0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey. Control positivo: Vydate (Oxamyl 1 mL L⁻¹ de agua). Blanco: medio Czapeck-Dox / extracto orgánico.

Negative control: water. Nt= no tested. / Control negativo: agua. NE = no evaluados

1: Yucatan 2: Veracruz 3: Tabasco. A: water B: leaves / 1: Yucatán 2: Veracruz 3: Tabasco. A: agua B: hojas.

screening of our fungal collections, nine active strains were chosen (*Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and four unidentified strains: TA13, 2TA6, 2TA7, and 2XA7). These strains were grown in Czapeck Dox, a defined liquid medium (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Therefore, the aim of this study was to test *in vitro* culture filtrates, and mycelia organic extracts (methanol and ethyl acetate) against second juvenile stage (J₂) of *M. incognita*, and to measure the median effective concentration of the most active samples.

MATERIALS AND METHODS

Stagonospora sp. TA34 y cuatro cepas no identificadas (TA13, 2TA6, 2TA7 y 2XA7). Éstas se cultivaron en medio líquido Czapeck Dox (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en evaluar *in vitro* filtrados de cultivos y extractos miceliales (acetato de etilo y metanol) de estos hongos contra el segundo estadio juvenil (J₂) de *M. incognita*, asimismo estimar la concentración efectiva media de los filtrados o extractos con mayor efectividad antagónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico. Cepas fúngicas (Cuadro 1) se activaron; de la colección de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de

Fungal material. Fungal strains (Table 1) from the culture collection of the biotechnology unit of the Scientific Research Center of Yucatán, C.A., were originally isolated from leaves and water samples collected in Tabasco, Veracruz, and Yucatan, Mexico (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2012).

Culture conditions and metabolites fungal extraction. All strains were cultured in potato dextrose agar (PDA) media at room temperature (25 ± 2 °C, 16/8 hours light/darkness) for one week, to obtain a suspension of hyphal fragments-spore suspension (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). One mL of the suspension was transferred to Czapek-Dox liquid medium (200 mL) contained in Roux bottles, with three replicates per isolate. These cultures were incubated for 2 weeks at room temperature, in stationary conditions. Then the culture y s were filtered through filter paper (Whatman® No. 42), to separate the mycelial mat and the culture filtrate. Mycelial mat was lyophilized (Labconco), ground to powder using a glass mortar, and the respective extract was obtained using ethyl acetate (3×, 100 mL for 24 h, each time), followed by methanol (3×, 100 mL for 24 h, each time) to obtain non-polar and polar compounds, respectively. Solvent was eliminated under reduced pressure until dryness to get organic crude extracts which were stored at 4 °C in the dark. Culture filtrates, ethyl acetate extracts (from mycelia and filtrate), as well as methanol extracts were tested for nematotoxic effects (Reyes-Estébanez *et al.*, 2008).

Nematotoxic assay. The nematode inoculum was prepared as previously described (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). All fungal extracts (300 mg mL^{-1}) were dissolved in 0.25 % tween 20, and culture filtrates (1 mL) were sterilized by filtration through 0.45 µm filter (Millipore) before use in bioassays

Yucatán, A.C., las cuales originalmente se aislaron de hojas y agua muestreadas en Tabasco, Veracruz y Yucatán, México (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2012).

Condiciones de cultivo y extracción de metabolitos de hongos. Todas las cepas se activaron en papa dextrosa agar (PDA) en condiciones de temperatura y luz controlada (25 ± 2 °C, 16/8 horas de luz / oscuridad) durante una semana, para después obtener una suspensión de fragmentos hifales o de esporas (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011). Un mL de la suspensión se transfirió a un medio líquido Czapek-Dox (200 mL) contenido en botellas Roux, con tres repeticiones por aislamiento. Estos cultivos se incubaron durante dos semanas a temperatura ambiente en condiciones estacionarias. Enseguida, los cultivos se filtraron a través de papel filtro (Whatman® No. 42), para separar el filtrado del micelio y obtener metabolitos polares. El material micelial se liofilizó (Labconco) y se pulverizó en un mortero de vidrio, para obtener el extracto respectivo mediante acetato de etilo (3×100 mL durante 24 h por tiempo), seguido de metanol ($3 \times$, 100 mL para 24 h, por tiempo) y extraer metabolitos no polares. El disolvente se eliminó a presión reducida hasta deshidratarlos completamente y obtener extractos orgánicos crudos, los cuales se almacenaron a 4 °C en oscuridad. Los filtrados de los cultivos y los extractos miceliales, sirvieron para su evaluación nematotóxica (Reyes-Estébanez *et al.*, 2008).

Ensayo Nematotóxico. El inóculo de nematodos se preparó previamente (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). Los extractos de acetato de etilo y metanólicos de los hongos se disolvieron (300 mg mL^{-1}) en 0.25 % de Tween 20, y se esterilizaron (1 mL) mediante filtración a través de papel filtro (Millipore) de 0.45 micras antes de su uso en los bioensayos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Candelero-de la

(Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Candelero-de la Cruz *et al.*, 2015). Initial assessments were conducted with freshly hatched J_2 (10 each replicate) which were placed in suspension, and incubated at room temperature in special glass dishes for J_2 mortality studies. Vydate (Oxamyl, 1 mL L⁻¹ of water) was used as positive control and negative control included distilled water and a blank (Czapeck-Dox medium extracts). Each extract was replicated four times and maintained under laboratory conditions using a completely randomized design. After 24 and 48 h, under a stereoscopic microscopic, the J_2 were touched with a needle and those that did not respond were classified as immobile. All J_2 were counted and classified as mobile and immobile. After 72 h, death of J_2 was confirmed by the transfer of immobile J_2 to distilled water and further examination (24 h).

Dose-inhibitory response curves using a dilution series (0, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 mg mL⁻¹) were prepared for three of the most active extract in culture filtrates and extracts (*Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, and unidentified 2XA7). In the case of culture filtrates, these were diluted to 50 and 25 % (v:v).

Results were reported as percentage of J_2 *M. incognita* mortality. For the analyses of variance data were arcsin transformed [$y = \arcsin(\sqrt{y/100})$] and significant differences among treatments were detected by Tukey's test ($P=0.05$) (Steel and Torrie, 1988). Effective concentrations (EC_{50} and EC_{95}) were obtained by transforming to "Probit" and ten-base logarithms the calculated percent mortality of data from the second assay (Throne *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

Cruz *et al.*, 2015). Para los estudios de mortalidad se realizaron con J_2 , (10 cada réplica) recién eclosionados los cuales se colocaron en siracusas especiales de vidrio con los extractos y se incubaron a temperatura ambiente. Se utilizó como control positivo un nematocida; Vydate (Oxamil 1 mL⁻¹), un tratamiento control negativo que incluyó agua destilada y un control blanco (el medio Czapeck-Dox). Cada extracto se repitió cuatro veces y se mantuvo bajo condiciones de laboratorio distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Después de 24 y 48 h, bajo un microscopio estereoscópico, los J_2 que no mostraron movilidad a través de un movimiento cuando se les estimuló la región cefálica se consideraron inmóviles. Después de evaluarse los tratamientos, los J_2 se clasificaron como móviles e inmóviles. Posteriormente después de 72 h, de exposición a los extractos, la mortalidad de los J_2 se confirmó al transferirlos en agua destilada sin los extractos por un periodo de observación de 24 h.

Se emplearon diferentes dosis inhibitoria utilizando diluciones (0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg mL⁻¹) para tres extractos y filtrados con mayor actividad (*Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 y no identificados 2XA7). En el caso de los filtrados, éstos se diluyeron a 50 y 25 % (v: v).

Los resultados de mortalidad de los J_2 de *M. incognita*, se expresaron en porcentajes. Para los análisis de varianza se tuvieron que transformar mediante la función de arco seno [$y = \arcsin(\sqrt{s/100})$] y cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se hizo la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P=0.05$) (Steel y Torrie, 1988). Las concentraciones letales (CE_{50} y CE_{95}) se obtuvieron mediante la transformación a logaritmos "Probit" base diez con los datos del porcentaje de mortalidad haciendo un segundo ensayo (Trono *et al.*, 1995).

Nematotoxic activity of culture filtrates and mycelium methanol extracts on *M. incognita* is summarized in Table 1. Ethyl acetate extracts did not show nematotoxic effect (<50 %). The results showed that the extracts from six strains (67 %) immobilize J₂ *M. incognita* in at least one of their filtrate or mycelial extract tested. Five culture filtrates at undiluted concentration of *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and two unidentified strains (TA13 and 2TA7), together two methanol extracts (*Aspergillus* sp. 2XA5 and unidentified 2XA7) displayed good effect (85-100 % mortality) on J₂. Moreover, there was observed that *Aspergillus* sp. 2XA5, followed by *Selenosporella* sp. MR26 displayed the most significant nematotoxic effect, in both, their culture filtrate and methanol mycelia extracts.

The toxicity of the filtrates and methanol extract obtained from liquid culture medium from *Selenosporella* sp. MR26 was higher as compare to the one shown by extracts derived from solid medium (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

When the juveniles were exposed to three different concentrations of the *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 and unidentified 2XA7 active filtrates (Figure 1), there was a concentration-dependent effect. The number of immobile J₂ was higher at 50 % concentration and almost all nematodes were paralyzed with a mean value of 75.8 % mortality at 48 h. The highest toxicity was observed with all undiluted filtrates from the active isolates. Similar results were reported for culture filtrate from *Nigrospora* sp., cultivated on Czapeck medium, when tested against juveniles of *M. incognita* (Amin, 2013) The nematicidal action of culture filtrates can be attributed to the production of toxic metabolites or enzymes, as in *F. solani*, where the action was a result of fungal toxins and unused sugar and salt residues present in the culture filtrate (Jain *et al.*, 2008; Regaieg *et*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad nematotóxica de los filtrados y de los extractos con acetato de etilo y metanólicos fúngicos contra *M. incognita* se resume en la Tabla 1. Los extractos con acetato de etilo no mostraron efecto nematotóxico (<50 %). Los resultados indicaron que los extractos de seis cepas (67 %) inmovilizaron a los J₂ de *M. incognita*. Cinco filtrados sin diluir provenientes de *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, y dos cepas no identificadas (TA13 y 2TA7), dos extractos metanólicos (*Aspergillus* sp. 2XA5 y no identificados 2XA7) mostraron efectos significativos en la inmovilidad de los J₂ de los nematodos (mortalidad de 85-100 %). El efecto nematotóxico más significativo se observó con los filtrado y los extractos metanólicos de *Aspergillus* sp. 2XA5, seguido por *Selenosporella* sp. MR26. La toxicidad de los filtrados en medios líquidos y de los extractos metanólicos de *Selenosporella* sp. MR26 fue mayor que cuando éstos se obtuvieron en medio solido (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011).

Cuando los juveniles se expusieron en filtrados en tres concentraciones diferentes de *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 y la cepa no identificados 2XA7 (Figura 1), el efecto dependió de la concentración. El número de J₂ inmóviles fue superior al 50 % en la más alta concentración de los extractos y al término de 48 h la mayoría de los nematodos se inmovilizaron con promedio de muerte del 75.8 %. La toxicidad más alta se observó con todos los filtrados sin diluir. Resultados similares se reportaron contra juveniles de *M. incognita* con filtrados de *Nigrospora* sp., cultivado en medio Czapeck (Amin, 2013). La acción nematicida de los filtrados se atribuye a la producción de enzimas y otros metabolitos tóxicos; en *Fusarium solani*, la acción tóxica fue asociado por la presencia de toxinas del hongo y no por los compuestos de

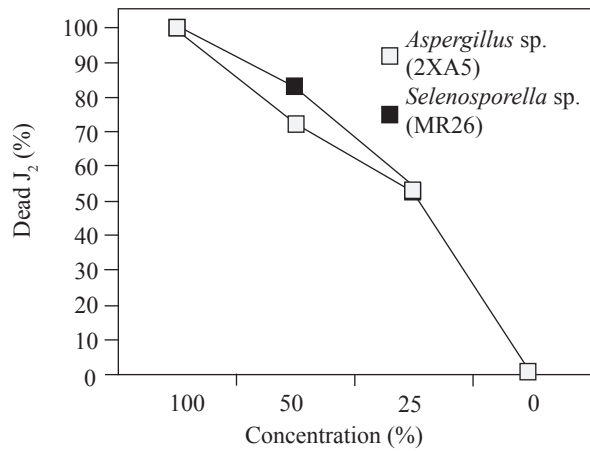


Figure 1. Nematotoxic effect of fungal culture filtrates at different dilutions (0, 25, 50, 100 % v/v) against J₂ of *Meloidogyne incognita* at 48 h.

Figura 1. Efecto nematotóxico de filtrados de cultivos fúngicos a diferentes diluciones (0, 25, 50, 100 % v/v) contra J₂ de *Meloidogyne incognita* a las 48 h.

al., 2010). On the other hand, enzymes could play a key role in fungal infection processes (Segers *et al.*, 1994). Extracellular hydrolytic enzymes such as lipases, chitinases and proteases are considered to be virulence determinants of entomopathogenic fungi and they are involved in complex processes leading to host cuticle penetration and cell digestion (Regaieg *et al.*, 2010).

The results of nematotoxic assays from culture filtrates and mycelia methanol extracts against *M. incognita* showed to be effective with only five polar extracts (Table 1). The best effect was produced by *Aspergillus* sp. 2XA5 and the unidentified strain 2XA7 (100 % mortality), followed by *Selenosporella* sp. MR26 (90 % mortality) at 48 h of exposure. Other strains such as *Stagonospora* sp. TA34 and the unidentified strain 2TA7 were less active than those mentioned above with 47 % nematode mortality at 24 h and up to 80 % mortality at 48 h. This nematotoxic effect was particularly interesting since the fungal strains

sales and azúcares que constituyen el medio de cultivo donde creció (Jain *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). También, por la presencia de enzimas que desempeñan un papel importante en los procesos de infección de los hongos, las cuales se relacionan con su efecto antagónico (Segers *et al.*, 1994). En este sentido, enzimas hidrolíticas extracelulares tales como; lipasas, quitinasas y proteasas en hongos entomopatógenos se consideran determinantes de virulencia, ya que están involucradas en los procesos de penetración de la cutícula y de la digestión celular (Regaieg *et al.*, 2010).

Los resultados de los ensayos nematotóxicos con los filtrados y los extractos metanólicos de micelio contra *M. incognita* mostraron eficacia solo en cinco cepas, y los extractos con actividad son de tipo polar (Cuadro 1). A las 48 h de exposición, el mejor efecto lo causaron los extractos provenientes de *Aspergillus* sp. 2XA5 y la cepa no identificada 2XA7 (100 % de mortalidad), seguido por *Selenosporella* sp. MR26 (90 % de mortalidad). Otras cepas como *Stagonospora* sp. TA34 y la cepa 2TA7 no identificada, fueron menos activos que los mencionados anteriormente con un 47 % de mortalidad de nematodos a las 24 horas y hasta un 80 % a las 48 h. Este efecto nematotóxico fue particularmente interesante ya que las cepas fúngicas que causan la inmovilidad del nematodo, es resultado de la acción de metabolitos intracelulares (endotoxinas) y extracelulares (exotoxinas). El efecto nematotóxico de la cepa no identificado 2XA7, sólo se produjo en el extracto micelial metanólico y no en el filtrado, lo que indica que la sustancia tóxica no es secretada por hifas fúngicas (endotoxina).

De acuerdo con la Tabla 1, los extractos metanólicos miceliales ejercieron la actividad nematotóxico más alta y se obtuvieron con *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, y la cepa no identificada 2XA7. Éstas al estimarse la CE₅₀ y CE₉₅ (Cuadro 2), la cepa no identificada 2XA7 fue más

could be causing nematode immobility as a result of intracellular (endotoxins) and extracellular metabolites (exotoxins). The nematotoxic effect of the unidentified fungus 2XA7 only occurred in the methanol extract and not in filtrate, indicating that the toxic substance is not secreted by fungal hyphae (endotoxin).

According to Table 1, mycelia methanol extracts with the highest nematotoxic activity obtained from *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, and the unidentified strain 2XA7 were chosen for estimation of EC_{50} and EC_{95} (Table 2). The most potent fungal extracts was the unidentified strain 2XA7 with a median effective dose of 0.08 mg mL^{-1} , followed by *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 (EC_{50} values of 0.20 and 0.26 mg mL^{-1} , respectively). These values are good in comparison with other fungal compounds isolated from *Paecilomyces lilacinus* 6029 (LC values of 3.03 mg mL^{-1}) and *Verticillium chlamyosporum* (500 mg L^{-1}) (Khambay *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2014). Furthermore, it was interesting to detect that *Selenosporella* sp. MR26 produces non polar nematotoxic metabolites when grown on solid fermented rice media (EC_{50} values of 0.91 mg mL^{-1}) and polar in Czapeck-Dox liquid medium (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Actually, the isolation and identification of the metabolites of *Selenosporella* sp. MR26 are in progress.

Table 2. Effective concentrations (EC_{50} and EC_{95}) of methanol extracts of those strains with the highest nematotoxic activity against J_2 of *Meloidogyne incognita* at 48 h.

Cuadro 2. Concentraciones efectivas (CE_{50} y CE_{95}) de extractos metanólicos de las cepas con la mayor actividad nematotóxica contra J_2 de *Meloidogyne incognita* a 48 h.

| Mycelia extract | mg mL ⁻¹ | |
|--------------------------------|---------------------|------------------|
| | EC ₅₀ | EC ₉₅ |
| <i>Aspergillus</i> sp. 2XA5 | 0.201 | 5.05 |
| <i>Selenosporella</i> sp. MR26 | 0.259 | 3.87 |
| Unidentified 2XA7 | 0.082 | 2.53 |

efectiva con una CE_{50} de 0.08 mg mL^{-1} , seguido por los extractos *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 (CE_{50} de 0.20 y 0.26 mg mL^{-1} , respectivamente). Estos valores se consideran buenos en comparación con la efectividad de compuestos aislados de otros hongos como *Paecilomyces lilacinus* 6029 (con valores de CE_{50} de 3.03 mg mL^{-1}) y *Verticillium chlamyosporum* (500 mg L^{-1}) (Khambay *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2014). Aunque el aislamiento y la identificación de los metabolitos de *Selenosporella* sp. MR26 están en progreso de identificación, es importante mencionar que *Selenosporella* sp. MR26 produce metabolitos nematotóxicos no polares, cuando se cultiva en medios sólidos fermentado de arroz (CE_{50} de 0.91 mg mL^{-1}) y metabolitos polares, cuando se desarrolla en medio líquido Czapeck-Dox (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Por otra parte, *Aspergillus* es un género ampliamente conocido con una producción altamente polifacética, cuyos metabolitos activos de varias especies han demostrado propiedades nematotóxicas, como *A. awamori* y *A. niger* contra *M. incognita* y *A. quadrilineatus* contra *M. javanica* (Bath y Wani, 2012). En *A. niger* se identificaron; brevianamide A, itaconitina, ácidos canadensico y micofenólico, y en *A. quadrilineatus* producción de flavoskyrina, dehydrocanadensolida y α -ácido Collatolico (Siddiqui y Futai, 2009; Akhtar y Panwar, 2013).

CONCLUSIONES

En el presente estudio, los datos obtenidos indican que *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 son promisorios para controlar J_2 de *M. incognita*. Ambos hongos producen en sus filtrados y en sus extractos metanólicos miceliales, metabolitos de naturaleza polar; responsables de la actividad nematotóxica. Se requiere de investigaciones

On other hand, *Aspergillus* is an extensively known genus with a highly prolific production of active metabolites, several species have shown nematotoxic properties such as *A. awamori* and *A. niger* against *M. incognita*, and *A. quadrilineatus* against *M. javanica* (Bath and Wani, 2012). From *A. niger* were brevianamide A, itaconitin, canadensic and mycophenolic acids, and *A. quadrilineatus* produces flavoskyrin, dehydrocanadensolide and α -Collatolic acid (Siddiqui and Futai, 2009; Akhtar and Panwar, 2013).

CONCLUSIONS

The experimental data obtained indicate that *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 are the most promissory fungi herein detected to control J₂ of *M. incognita*. Both fungi produce great nematotoxic effect in their culture filtrates and methanol mycelia extracts which indicate polar nature of the metabolites responsible of the activity. Furthermore investigations are required to identify and characterize the molecules responsible for the activity of the potential candidates detected in this study. It will also be necessary to carry out greenhouse trials to tests these nematotoxic metabolites, and finally verify the environmental safety of their use.

Acknowledgements

The authors thank Irma L. Medina-Baizabal, Manuela Reyes, Narcedalia Gamboa, and Sergio Pérez for their valuable technical assistance. This research was supported by CONACyT (Projects No. 47549 and 2009/CB131256), and by Undergraduate Student Fellowship to Jaime Perez Cruz.

LITERATURE CITED

adicionales para identificar y caracterizar las moléculas de los metabolitos potenciales; responsables de la actividad detectada en este estudio. También es necesario realizar ensayos en invernadero y verificar la seguridad ambiental de su uso.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Irma L. Medina-Baizabal, Manuela Reyes, Narcedalia Gamboa y Sergio Pérez, por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue apoyada por el CONACyT (Proyectos N° 47549 y 2009 / CB131256) y por la beca otorgada a Jaime Pérez Cruz.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Akhtar MS, and Panwar J. 2013. Efficacy of root-associated fungi and PGPR on the growth of *Pisum sativum* (cv. Arkil) and reproduction of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of Basic Microbiology 53:318–326. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100610>
- Amin N. 2013. Investigation of culture filtrate of endophytic fungi *Nigrospora* sp. isolate RS 10 in different concentrations towards root-knot nematode *Meloidogyne* spp. Indian journal of Science and Technology 6:5177–5181. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2013/v6i9/37130>
- Bhat MY, and Wani AH. 2012. Bio-activity of fungal culture filtrates against root-knot nematode egg hatch and juvenile motility and their effects on growth of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) infected with the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45:1059–1069. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2012.655578>
- Bhattacharjee R, and Dey U. 2014. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. African Journal of Microbiology Research 17:1749-1762. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2013/v6i9/37130>
- Candelero-De la Cruz J, Cristóbal-Alejo J, RA Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Gamboa-Angulo MM, and Ruíz-Sánchez E. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Phytan International Journal of Experimental Botany 84:113-119. Disponible en línea: <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol84.html>
- Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Moguel-Catzin S, Marbán-Mendoza N, Medina-Baizabal IL, Simá-Polanco P, Peraza-Sánchez SR, and Gamboa-Angulo MM. 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. Nematropica 36:89–97.

- Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69732/67392>
- Dong J, Zhu YA, and Song HB. 2007. Nematicidal resorcylics from the aquatic fungus *Caryospora callicarpa* YMF1.01026. *Journal of Chemical Ecology* 33:1115–1126. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-007-9256-7>
- Gamboa-Angulo M, De la Rosa-García SC, Heredia-Abarca G, Medina-Baizabal IL. 2012. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 6:2305–2312. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.1129>
- Hernández-Carlos B, Gamboa-Angulo MM. 2011. Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews* 10:261–286. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-010-9192-y>
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Góngora-Jiménez JA, y Lomas-Barrie CT. 2011. Nematofauna nociva (*Meloidogyne* spp.) en cultivos hortícolas tropicales: Distribución y perspectivas de manejo en Yucatán. In: Gamboa AM, Rojas HR (eds.). Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México. Vol 1. México: Subnargem, Sagarpa. Morevalladolid S. de R.L. de C.V., 138–150. [http://www.researchgate.net/publication/256458732\\_Recursos\\_geneticos\\_microbianos\\_en\\_la\\_Zona\\_Golfo-Sureste\\_de\\_Mexico](http://www.researchgate.net/publication/256458732_Recursos_geneticos_microbianos_en_la_Zona_Golfo-Sureste_de_Mexico)
- Jain A, Mohan J, Singh M, and Goswami BK. 2008. Potentiality of different isolates of wilt fungus *Fusarium oxysporum* collected from rhizosphere of tomato against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Environmental Science and Health B* 43:686–691. <http://dx.doi.org/10.1080/03601230802388777>
- Khambay BPS, Bourne JM, Cameron S, Kerry BR, and Zaki MJ. 2000. A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamyosporium*. *Pest Management Science* 56:1098–1099. [http://dx.doi.org/10.1002/1526-4998\(200012\)56:12<1098::AID-PS244>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1526-4998(200012)56:12<1098::AID-PS244>3.0.CO;2-H)
- Regaieg H, Ciancio A, Raouani NH, Grasso G, and Rosso L. 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:2285–2289. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0397-4>
- Reyes-Estebanez M, Heredia-Abarca G, y Gamboa-Angulo MM. 2008. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología* 28:49–56. Disponible en línea [http://revistamexicanademicrobiologia.org/wp-content/uploads/2009/10/RMM\\_2009\\_28\\_049-056.pdf](http://revistamexicanademicrobiologia.org/wp-content/uploads/2009/10/RMM_2009_28_049-056.pdf)
- Reyes-Estebanez M, Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Heredia-Abarca G, Canto-Canché B, Medina-Barizabal BI, and Gamboa-Angulo M. 2011. Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 5:1083–1089. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.121>
- Segers R, Butt TM, Kerry BR, and Peberdy JF. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. *Microbiology* 140:2715–2723. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-140-10-2715>
- Sharma A, Sharma S, and Dalela M. 2014. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis* 75:16–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.08.007>
- Shinya R, Aiuchi D, Kushida A, Tani M, Kuramochi K, and Koike M. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology* 97:291–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.11.005>
- Siddiqui ZA, and Futai K. 2009. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure. *Pest Management Science* 65:943–948. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150801896043>
- Steel RDG, and Torrie JH. 1988. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. Segunda edición. McGraw-Hill. DF, México. 662 p.
- Szabó M, Urbán P, Virányi F, Kredics L, and Fekete C. 2013. Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during *in vitro* nematodes egg-parasitism. *Biological Control* 67: 337–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.002>
- Throne JE, Weaver DK, and Baker JE. 1995. Probit analysis: Assessing goodness-of-fit based on block transformation and residuals. *Journal of Economic Entomology* 88:1513–1516. <http://jee.oxfordjournals.org/content/88/5/1513>
- Xalxo PC, Karkur D, and Poddar A.N. 2013. Rhizospheric fungal association of root knot nematode infested cucurbits: *in vitro* assessment of their nematicidal potential. *Research Journal of Microbiology* 2: 81–91. <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2013.81.91>



## Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México

### Etiology of wilt and basal rot of *Jatropha curcas* in Arriaga, Chiapas, Mexico

Wester Moisés Salazar-Pinacho, Ricardo René Quiroga-Madrigal, María de los Ángeles Rosales-Esquinca, Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera Ocozocoautla-Villaflores km 84.5, Villaflores, Chiapas, CP 30470, México; Eduardo Raymundo Garrido-Ramírez, INIFAP-Campo Experimental Centro de Chiapas, Carretera Ocozocoautla-Cintalapa km 3, Ocozocoautla, Chiapas, CP 29140, México; Francisco Holguín-Meléndez, El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Carretera Antiguo Aeropuerto km. 2.5. Tapachula, Chiapas, CP 30700, México. Correspondencia: quiroga@unach.mx

Recibido: 30 de Julio, 2015.

Aceptado: 16 de Noviembre, 2015.

Salazar-Pinacho WM, Quiroga-Madrigal RR, Rosales-Esquinca MA, Garrido-Ramírez ER y Holguín-Meléndez F. 2016. Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 110-115.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-5)

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

**Resumen.** En el municipio de Arriaga, Chiapas, México, a partir del 2009 existe la muerte de plantas de piñón (*Jatropha curcas* L.) de 1 y 2 años de edad, con síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo. La incidencia registrada es hasta un 85 %; con una alta virulencia del patógeno ya que ocasiona la muerte de la planta en un lapso de 20 a 30 días. El objetivo del presente trabajo fue determinar el agente causal de la muerte de plantas de piñón. A partir de muestras de campo de tejido enfermo de la base del tallo y raíz, se realizaron a nivel de laboratorio, aislamientos en cajas Petri con medio B de King (BK) y cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC); las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Los

**Abstract.** In the municipality of Arriaga, Chiapas, the death of physic nut (*Jatropha curcas* L.) 1 and 2-year old plantations has been observed since 2009, with symptoms of wilting and basal stem rot. The registered incidence has been up to 85 %; the virulence of the pathogen is very high because it causes the death of the plant in a period of 20 to 30 days. The objective of this study was to determine the causal agent of the physic nut death. Laboratory isolates were conducted from field samples of diseased plant material of stem and root tissue, in Petri dishes with B King (BK) and triphenyl tetrazolium chloride (TTC) medium, incubated at 28 °C for 48 h. The isolates obtained were purified and subjected to biochemical and hypersensitivity tests on tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi. The identification was positive for three isolates of *Ralstonia solanacearum*. However, it was not possible to complete Koch's postulates; therefore, *R. solanacearum* is only consigned at association level.

aislamientos obtenidos fueron purificados y sometidos a pruebas bioquímicas y de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi. La identificación fue positiva para tres cepas de *Ralstonia solanacearum*. Sin embargo, no fue posible completar los postulados de Koch por lo que se consigna a *R. solanacearum* nivel de asociación.

**Palabras claves adicionales:** piñón, *Ralstonia solanacearum*, diagnosis, pruebas bioquímicas.

El piñón (*Jatropha curcas* L.) se utiliza como cerco vivo en predios agrícolas debido a su fácil propagación, manejo y rápido crecimiento. A nivel mundial se estudia como cultivo bioenergético para la obtención de biodiesel, lo que contribuye a disminuir la emisión de gases efecto invernadero y mitigar el calentamiento global (Zamarripa y Solís, 2013). En Arriaga, Chiapas, desde el 2009 se observan plantaciones comerciales con muerte de plantas de piñón de 1 y 2 años de edad, las plantas afectadas presentan síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la etiología de la marchitez y pudrición basal del tallo del piñón en Arriaga, Chiapas.

Se colectaron muestras de plantas con síntomas de marchitez y pudrición basal del tallo en dos plantaciones de piñón, ubicadas en Arriaga, Chiapas: 1) Lote de 90 ha de piñón originario de la India, sembrado a partir de semilla en 2008, en el Rancho San Jacinto, ubicado a 16° 13' 18" de latitud norte y 94° 01' 07" longitud oeste, con una altitud de 50 msnm; 2) Lote de 3 ha de piñón de Chiapas, sembrado a partir de semilla en 2010, propiedad de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado a 16° 11' 05" de latitud norte y 93° 55' 57" longitud oeste, con una altitud de 38 msnm. Las muestras se procesaron y se analizaron en condiciones de laboratorio. De material vegetal enfermo se obtuvieron secciones de 5 mm, desin-

**Additional keywords:** Physic nut, *Ralstonia solanacearum*, diagnosis, biochemical tests.

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is used as a living fence, due to its fast spreading, handling, and quick growth. It is studied worldwide as a bioenergy crop to obtain biodiesel, which helps reduce the emission of greenhouse gases and mitigate global warming (Zamarripa and Solís, 2013). In Arriaga, Chiapas, since 2009, commercial plantations have been observed to contain dead 1- and 2-year old physic nut plants, which presented symptoms of wilting and basal stem rot. The aim of this study was to determine the etiology of the wilting and basal stem rot in the physic nut plant in Arriaga, Chiapas.

Samples with symptoms of wilting and basal stem rot were gathered in two physic nut plantations located in Arriaga, Chiapas: 1) a 90 ha lot with physic nuts from India, planted from seeds in 2008 in Rancho San Jacinto, located at 16° 13' 18" latitude north and 94° 01' 07" longitude west, at an altitude of 50 masl; 2) 3 ha lot with physic nut from Chiapas, planted from seeds in 2010, property of the Autonomous University of Chiapas, located at 16° 11' 05" latitude north and 93° 55' 57" longitude west, at an altitude of 38 masl. The samples were processed and analyzed under laboratory conditions. Cross sections of 5 mm of diseased plant material were obtained, disinfected superficially with 1 % sodium hypchlorite, rinsed with sterile distilled water and planted in Petri dishes with B King. The dishes were incubated at 28 °C for 48 hours; the culture formed was transferred to a new culture medium, using an inoculation loop, using the Streak Plate Method. Different tests were carried out with pure cultures, including: the hypersensitivity reaction test, with the infiltration of a bacterial solution at 1.2x10<sup>9</sup> UFC/mL in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi)

fectadas superficialmente en hipoclorito de sodio al 1 %, se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron en cajas Petri con medio B de King, las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 horas, de las colonias formadas con una asa bacteriológica se realizaron transferencias a nuevo medio de cultivo mediante la técnica de estría cruzada. Con colonias puras se realizaron diferentes pruebas, las cuales incluyeron: prueba de reacción de hipersensibilidad, mediante la infiltración de una solución bacteriana a  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) de plantas de 60 días de edad, la concentración fue estimada con la escala de McFarland (1907); prueba de pudrición en tubérculo de papa del cv. Alpha, mediante inoculaciones de crecimiento bacteriano en incisión en rodajas bajo condiciones asépticas; pruebas bioquímicas auxiliares para la identificación en medio de cultivo cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), tinción de Gram, prueba de KOH, producción de la enzima citocromo oxidasa, producción de la enzima catalasa con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), producción de la enzima ureasa en medio de cultivo de Christensen, metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa en medio de cultivo Hugh y Leifson (Denny y Hayward, 2001).

Las plantas que fueron colectadas en campo (predios comerciales) presentaron síntomas de marchitamiento en hojas, pudrición bacteriana en la base del tallo y raíz, lo anterior coincide con la descripción de síntomas reportados por Hendroko *et al.* (2008), Ginting y Maryono (2009) y Hidayah y Yulianti (2009). Se observó hasta 85% de muerte de plantas afectadas de entre 1 y 2 años de edad, en un lapso de 20 a 30 días después del inicio del brote epidémico. La incidencia de la enfermedad disminuyó notablemente cuando el cultivo alcanzó el tercer año de edad. A partir de las muestras colectadas en campo se obtuvieron 16 cepas, 11 de las cuales, se descartaron mediante la prueba de

leaves from 60-day old plants. Concentration was calculated using the McFarland scale (1907), a test of rotting in potato tubercula of the cv. Alpha, by inoculations of bacterial growth in incision in slices under aseptic conditions; auxiliary biochemical identification tests in a triphenyl tetrazolium chloride (TTC) culture media, Gram staining, KOH test, production of the enzyme cytochrome oxidase, production of the enzyme catalase with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), production of the enzyme urease in a Christensen culture media, oxidative and/or fermentative metabolism of glucose in a Hugh and Leifson culture media (Denny and Hayward, 2001).

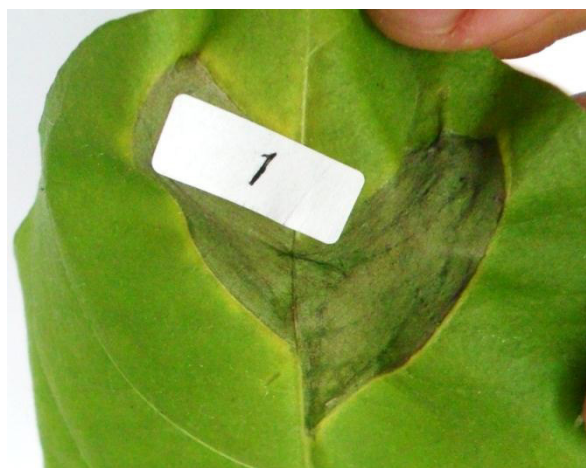
The plants gathered from commercial fields displayed symptoms of wilting on leaves, bacterial rot on the base of the stem and root. This corresponds with the description of symptoms reported by Hendroko *et al.* (2008), Ginting and Maryono (2009), and Hidayah and Yulianti (2009). Up to 85 % less plants aged 1 to 2 years died in a time lapse of 20 to 30 days after the beginning of the epidemic. The incidence of the disease fell noticeably when the crop reached its third year of age. From the samples gathered on the field, 16 strains were obtained, 11 of which were discarded using the test of hypersensitivity on tobacco and the biochemical tests applied on it. Strains 1 and 3B showed positive results on the hypersensitivity test on tobacco after 48 h (Figure 1), and strain P3 also showed positive results or variables after 72 h; in this sense, Ji *et al.* (2007) mentioned that *R. solanacearum* shows variability in the response to hypersensitivity. Finally, negative results were obtained for this test with strains P1 and P2.

In the potato tubercule rotting tests, results were positive for all five bacterial strains, which coincides with Rodríguez (2012), who mentioned that for isolated bacterias from organisms with rotting, pathogenicity can be valued with this test.

hipersensibilidad en tabaco y las pruebas bioquímicas aplicadas. Las cepas 1 y 3B, presentaron resultados positivos en la prueba de hipersensibilidad en tabaco a las 48 h (Figura 1), también, la cepa P3 presentó resultados positivos o variables a las 72 h; en este sentido, Ji *et al.* (2007) mencionaron que *R. solanacearum* muestra variabilidad en la respuesta de la reacción de hipersensibilidad. Finalmente, se obtuvieron resultados negativos para esta prueba con las cepas P1 y P2.

En las pruebas de pudrición en tubérculo de papa los resultados obtenidos fueron positivos para las cinco cepas bacterianas, lo cual coincide con Rodríguez (2012) quien mencionó que para bacterias aisladas de organismos con pudrición, la patogenicidad se puede valorar con esta prueba.

Las cinco cepas bacterianas aisladas de piñón dieron positivas en medio TTC, con el desarrollo de colonias de color rojo y bordes blancos, características distintivas de colonias virulentas de *R. so-*

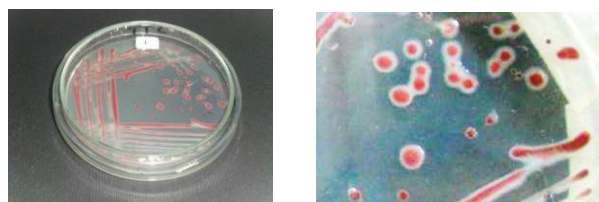


**Figura 1.** Resultado positivo a las 48 h, de la prueba de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi, realizado con la cepa 1 aislada de piñón.

**Figure 1.** Positive result after 48 h for the hypersensitivity test on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Xanthi, performed on the isolated strain 1 of physic nut.

The five isolated bacterial strains from physic nut were positive in a TTC media, with the growth of colonies colored red with white edges, distinctive features of colonies infected with *R. solanacearum* (Figure 2). These results coincide with reports by Perea *et al.* (2011), who reported that the growth of *R. solanacearum* colonies in a TTC growth media are characterized by a red color with white edges. The Gram staining and biochemical tests for oxidase, catalase, urease, coincide with reports by Yabuuchi *et al.* (1995), Denny and Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012) and Rodríguez (2012) (Table 1).

The wilting and basal rotting of *Jatropha curcas* in Arriaga, Chiapas, Mexico are characterized by symptoms of flabbiness in petioles, wilting and loss of leaves, rotting in the root and base of the stem, production of adventitious roots and senescence 20 to 30 days after the first symptoms. Out of 16 isolated bacterial strains in physic nut plants that underwent the tobacco hypersensitivity test, three strains coincide with the characteristics for *R. solanacearum*. Although Koch's postulates were



**Figura 2.** Crecimiento en medio TTC de la cepa P1 aislada de *Jatropha curcas* con síntomas de marchitez y pudrición bacteriana; se observa el color rojo rodeado de una zona blanca, típico de las colonias de *R. solanacearum*.

**Figure 2.** Growth in a TTC media of the P1 isolated strain of *Jatropha curcas* with symptoms of wilting and bacterial rotting; a red color is observable, surrounded by a white area, typical of *R. solanacearum* cultures.

*lanacearum* (Figura 2), estos resultados coinciden con lo reportado por Perea *et al.* (2011), quienes reportaron que el crecimiento de colonias bacterianas de *R. solanacearum* en medio de cultivo TTC se caracterizan por una coloración rojiza con bordes blanquecinos. La tinción de Gram y pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, ureasa coincide con lo reportado por Yabuuchi *et al.* (1995), Denny y Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012) y Rodríguez (2012) (Cuadro 1).

Se caracteriza a la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México con síntomas de flacidez de pecíolos, marchitamiento y caída de hojas; pudrición de raíz y base del tallo, producción de raíces adventicias y se-

not fulfilled, this is the first report on the relation of *Ralstonia solanacearum* in wilting and basal rotting of the physic nut plant in Chiapas, Mexico.

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

nescencia entre 20 a 30 días después de los primeros síntomas. De 16 cepas bacterianas aisladas de piñón, al someterlas a la prueba de hipersensibilidad de tabaco y pruebas bioquímicas, tres cepas coinciden con las características para *R. solanacearum*. Aunque los postulados de Koch no fueron realizados, este es el primer reporte de la asociación de *Ralstonia solanacearum* en la marchitez y pudrición basal del piñón en Chiapas, México.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas y de patogenicidad realizadas a cinco cepas bacterianas aisladas de *Jatropha curcas*.
Table 1. Biochemical and pathogenicity tests performed on five bacterial strains of *Jatropha curcas*.

| Prueba | Cepa bacteriana | | | | | | <i>Ralstonia solanacearum</i> ² |
|--|-----------------|----|----|----|-----|----------------------|--|
| | 1 | 3B | P1 | P2 | P3 | Testigo ¹ | |
| TTC colonias rojas y bordes blancos | + | + | + | + | + | + | + |
| BK pigmento fluorescente | - | - | - | - | - | - | - |
| BK pigmento difusible | - | - | - | - | - | - | - |
| YDC colonia amarilla-crema | - | - | - | - | - | - | - |
| YDC colonia mucoides 30 °C | + | + | + | + | + | + | + |
| Tinción de Gram | - | - | - | - | - | - | - |
| Reacción KOH | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | + | + | + | + | + | + | + |
| Ureasa | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + |
| Hugh y Leifson aerobiosis | + | + | + | + | + | + | + |
| Hugh y Leifson anaerobiosis | - | - | - | - | - | - | - |
| Hipersensibilidad en tabaco ³ | + | + | - | - | +/V | + | +/V |
| Pudrición de tubérculo de papa | + | + | + | + | + | + | + |

¹Testigo = Cepa de referencia aislada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) identificada y proporcionada por el Lab. de Fitopatología, Depto. de Microbiología, Esc. Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. / ¹Control = Isolated reference strain from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) identified and provided by the Lab. Of Plant Disease, Dept. of Microbiology, National School of Biological Science, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City.

²Respuesta de *R. solanacearum*, según Denny y Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012), Rodríguez (2012) / ²Response of *R. solanacearum*, according to Denny and Hayward (2001), Dhital (2001), EPPO (2004), Rahman *et al.* (2010), Perea *et al.* (2011), Marques *et al.* (2012), Rodríguez (2012).

³V = Variable.

BIBLIOGRAFÍA

- Denny TP and Hayward AC. 2001. *Ralstonia*. In: Schaad NW, Jones JB and Chun W (eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. Pp. 151-174.
- Dhital SP, Thaveechai N and Shrestha SK. 2001. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains of potato wilt disease from Nepal and Thailand. Nepal Agriculture Research Journal 5:42-47. <http://www.nepjol.info/index.php/NARJ/article/download/4868/4034>.
- EPPO. 2004. EPPO Standards: Diagnostic protocols for regulated pests. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin 34:155-157. [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-21\(1\).pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-21(1).pdf)
- Ginting C and Maryono T. 2009. Physic nut (*Jatropha curcas* L.) diseases in Lampung province. Biotropia 16(1):45-54. <http://journal.biotrop.org/index.php/biotropia/article/view/66/45>
- Hendroko R, Karmawati E, Mahmud Z and Soekamto. 2008. The attack of disease occurred at ETF *Jatropha* seed garden. Cikarang, Indonesia. Presented in poster at Kuala Lumpur *Jatropha* Summit, Indonesia. www.slideshare.net/greenmile/jatropha-presentation (consulta, febrero 2014).
- Hidayah N and Yulianti T. 2009. Development of bacterial wilt of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Muktiharjo Experimental Station. Proceedings of the Third National Workshop on *Jatropha*. Indonesia Tobacco and Fiber Crops Research Institute. Malang, East Java, Indonesia. Pp. 308-312. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/eng/images/jarpag3/pen/nurul%20mp.pdf> (consulta, febrero 2014).
- Ji P, Allen C, Sánchez PA, Elphinstone JG, Jones JB and Momol MT. 2007. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Disease 91:195-203. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0195>
- Marques E, Uesugi CH, Ferreira MASV and Rezende DV. 2012. Characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* biovar2, pathogenic to *Eucalyptus* "urograndis" hybrids. Tropical Plant Pathology 37(6):399-408. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762012000600004>
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association 49(14):1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Perea-S JM, García-E RS, Allende-M R, Carrillo-F JA, León-F J, Valdez-T B y López-S FSM. 2011. Identificación de razas y biovares de *Ralstonia solanacearum* L. aisladas de plantas de tomate. Revista Mexicana de Fitopatología 29(2):98-108. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222864002>
- Rahman MF, Islam MR, Rahman T and Meah MB. 2010. Biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of brinjal in Bangladesh. Progressive Agriculture 21(1-2):9-19. <http://dx.doi.org/10.3329/pa.v21i1-2.16744>
- Rodríguez-M. ML. 2012. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. 3ª edición. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 146 p.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H and Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>
- Zamarripa-Colmenero A y Solís-Bonilla JL. (eds.). 2013. *Jatropha curcas* L., alternativa bioenergética en México. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Rosario Izapa. Tapachula, Chiapas, México. 157 p.

Nematodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* AA) en el centro de Veracruz, México

Plant parasitic nematodes associated to banana roots (*Musa acuminata* AA) in central Veracruz, México

Soledad Victoria Lara Posadas, Ángel Enrique Núñez Sánchez Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzálo Aguirre Beltrán S/N, Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz, CP 91090, México; Daniel López-Lima, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario 100, Toluca, Estado de México, CP 50000, México; Gloria Carrión* Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec No. 351, Xalapa, Veracruz CP 91070 México. *Correspondencia: gloria.carrion@inecol.mx.

Recibido: 3 de Agosto, 2015.

Aceptado: 16 de Noviembre, 2015.

Lara-Posadas AV, Núñez-Sánchez AE, López-Lima D y Carrión G. 2016. Nematodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* AA) en el centro de Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 116-130.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-7](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-7)

Primera Publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

Resumen. Los nematodos fitoparásitos constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan el cultivo de plátano a nivel mundial. En México este frutal es uno de los principales productos agrícolas y en el estado de Veracruz, la zona más importante de producción se ubica en los municipios de Atzalan y Tlapacoyan. En algunos cultivos de plátano de estos municipios se han detectado plantas con lesiones y engrosamientos en la raíz, síntomas inducidos por nematodos. Con la finalidad de determinar que nematodos estaban asociados a esta sintomatología, se colectaron raíces en seis plantaciones de los municipios Atzalan y Tlapacoyan durante el mes de abril de 2014.

Abstract. Plant parasitic nematodes are among the major phytosanitary problems affecting banana crops worldwide. In México, this fruit is one of the main agricultural products and in the state of Veracruz the most important production area is located in the Atzalan and Tlapacoyan municipalities. In some farms of these municipalities banana plants with lesions and galling of the root, symptoms caused by nematodes, have been detected. To determine which nematodes were associated with these symptoms, roots were collected in six plantations of Atzalan and Tlapacoyan municipalities in April 2014. Identification of nematodes was performed according to their morphological characteristics, and in the case of *Meloidogyne* species, specific molecular markers were used. The number of nematodes per 100 g root was also quantified. *Helicotylenchus* sp. *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Criconema* sp., *Helicotylenchus multicinctus* and *Radopholus similis* were detected involved in the affecting of root system. The last four are recorded for the first time in the Veracruz banana plantations.

La identificación de los nematodos se realizó de acuerdo a sus características morfológicas y en el caso de las especies de *Meloidogyne*, se utilizaron marcadores moleculares específicos. Asimismo se cuantificó el número de nematodos en 100 g de raíz. Se detectaron *Helicotylenchus* sp. *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Criconema* sp., *Helicotylenchus multicinctus* y *Radopholus similis* involucrados en la afectación del sistema radical. Los últimos cuatro se registran por primera vez en el cultivo de plátano en Veracruz.

Palabras clave: *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Criconema* sp.

El cultivo de plátano es una actividad importante para México, se siembran más de 75 mil hectáreas, con un valor de la producción de más de 5 mil millones de pesos (SIAP, 2014). En el estado de Veracruz, la principal zona de producción de este cultivo es el distrito de Martínez de la Torre (SIAP, 2014). Durante los últimos cinco años en algunas plantaciones de plátano pertenecientes a este distrito se han registrado síntomas característicos de deficiencia de nutrimentos, además se ha observado poco desarrollo y necrosis del sistema radical, lo que ocasiona la caída de las plantas. Estos últimos síntomas se han asociado con los inducidos por nematodos fitoparásitos, sin embargo, no se han realizado estudios para detectar su presencia en esta importante zona productora. El objetivo del presente trabajo fue identificar las especies de nematodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* Colla AA), sub grupo Pisang Mas con síntomas de afectación en los municipios de Atzalan y Tlapacoyan ubicados en la zona centro del Estado de Veracruz, México. Para el estudio se eligieron 3 plantaciones de plátano en cada municipio con reportes previos de afectaciones en la raíz (cuadro 1). En cada una de las plantaciones

Key words: *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Criconema* sp.

Banana is an important crop in Mexico. It accounts for over 75,000 hectares with production estimated at more than 5000 million Mexican pesos (SIAP, 2014). In the Mexican state of Veracruz, the main banana production area is located in Martínez de la Torre District (SIAP, 2014). In the last five years, characteristic nutrient deficiency symptoms have been observed in some banana plantations in this District, as well as poor development and root necrosis, which causes plants to fall. The latter symptoms are associated to those caused by plant parasitic nematodes. However, no studies have been conducted to detect their presence in this important production area. This study aimed to identify plant parasitic nematodes associated with banana root (*Musa acuminata* Colla AA), subgroup Pisang Mas, showing infestation symptoms in the municipalities of Atzalan and Tlapacoyan, located in the central part of the state of Veracruz, Mexico. For this study, three banana plantations were selected in each municipality where root infestation has been reported (Table 1). At each plantation, five root samples (500 g) were collected (N=30) at 15-20 depth and 20-cm from the pseudo-stalk of the selected plants (Adriano-Anaya *et al.*, 2008).

Nematodes were extracted from 100 g of root using the maceration, flotation and centrifugation technique (van Bezooijen, 2006); they were fixed and cleared according to Seinhorst (1962) and then taxonomically classified and quantified. At the same time, females of the genus *Meloidogyne* were extracted by dissecting plant material (100 g of root) to make perineal cuts. *Meloidogyne* spp. eggs were also extracted from 200 g of root using the maceration in sodium hypochlorite (NaOCl), flotation and centrifugation technique. The extracted nematodes were kept in an ultrafreezer

se tomaron 5 muestras (N=30) de raíces (500 g) a una profundidad de 15 a 20 cm y a una distancia de 20 cm alrededor del pseudo tallo de las plantas seleccionadas (Adriano-Anaya *et al.*, 2008).

Los nematodos se extrajeron de 100 g de raíz mediante la técnica de maceración, flotación y centrifugación (van Bezooijen, 2006), se fijaron y aclararon de acuerdo a Seinhorst (1962) para posteriormente realizar la identificación taxonómica y la cuantificación. Paralelamente, hembras del género *Meloidogyne* se extrajeron con la técnica de disección del material vegetal (100 g de raíz) para realizar cortes perineales. Asimismo se extrajeron huevos de *Meloidogyne* spp. con el método de maceración en hipoclorito de sodio (NaOCl), flotación y centrifugación de 200 g de raíz, la extracción resultante se preservó en ultracongelador (Thermo Scientific) a -80 °C para la posterior extracción de ADN (Carneiro *et al.*, 2004). Los nematodos recuperados de la primera extracción se observaron y cuantificaron (100 gr raíz) en un microscopio óptico (Leica ICC50). Con el fin de identificar los nematodos, se eligieron los mejores especímenes adultos para realizar montajes (van Bezooijen, 2006) y seguir las claves taxonómicas especializadas para el orden Tylenchida (Siddiqi, 1973; Orton-Williams, 1973; Orton-Williams y Siddiqi, 1973; Orton-Williams, 1975; Siddiqi, 2000). Debido a la similitud en las características morfológicas de algunas especies de *Meloidogyne* (Carneiro y Cofcewicz 2008) se realizó también la determinación con marcadores moleculares específicos. Para esto se extrajo el ADN de los huevos y J2 previamente extraídos de la raíz y congelados siguiendo el protocolo de extracción de ADN del kit DNATissue and Insect MiniPrep Isolation Kit (Zymo Research) y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando marcadores SCAR (secuencia caracterizada de la región amplificada) (Sigma-Aldrich) específicos para las cuatro especies de *Meloidogyne* más distribuidas

(Thermo Scientific) at -80 °C for subsequent DNA extraction (Carneiro *et al.*, 2004). Nematodes recovered from the first extraction were observed and quantified (100 g of root) under an optical microscope (Leica ICC50). To identify nematodes, the best adult specimens were selected for mounts (van Bezooijen, 2006) and according to the specialized taxonomic keys of the order of Tylenchida (Siddiqi, 1973; Orton-Williams, 1973; Orton-Williams y Siddiqi, 1973; Orton-Williams, 1975; Siddiqi, 2000). Given the similarity of morphological characteristics of some species of *Meloidogyne* (Carneiro and Cofcewicz 2008), were identified also using specific molecular markers. For this purpose, DNA was extracted from eggs and J2 previously extracted from roots and frozen using the DNA protocol from the DNA Tissue and Insect MiniPrep Isolation Kit (Zymo Research) to conduct a Polymerase Chain Reaction (PCR) test with SCAR markers (Sequence Characterized Amplified Region) (Sigma-Aldrich) specific to the four *Meloidogyne* species most widely distributed in banana plantations in Latin America: *M. arenaria* (F5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3' and R5'-TCGGCGATAGACACTACAACT-3' 420 base pairs), *M. incognita* (F5'-GGGATGTGTAAATGCTCCTG-3' y R 5'-CCCGCTACACCCTCAACTTC-3' 399 pb), *M. javanica* (F5'-GGTGCGCGATTGAACTGAGC-3' and R 5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3' 670 pb) and *M. paranaensis* (F 5'-GCCCCGACTCCATTTGACGGA-3' and R 5'-CCGTCCAGATCCATCGAAGTC-3' 208 pb) (Zijlstra *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2002). PCR tests were carried out in a final volume of 30 µL with 6.3 µL of sterile distilled H₂O, 6 µL of reaction buffer at 5X concentration (Promega), 3 µL of dNTP at 10 µM, 1.5 µL of MgCl₂ at 25 µM (Promega) 6 µL of the corresponding SCAR primer (10 µM), 0.2 µL

en el cultivo de plátano en Latinoamérica: *M. arenaria* (F5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3' y R5'-TCGGCGATAGACTACAACT-3' 420 pares de bases), *M. incognita* (F5'-GGGATGTGTAATGCTCCTG-3' y R 5'-CCCGCTACACCCTCAACTTC-3' 399 pb), *M. javanica* (F5'-GGTGCGCGATTGAACTGAGC-3' y R 5'-CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAAC-3' 670 pb) y *M. paranaensis* (F 5'- GCCCGACTC-CATTTGACGGA-3' y R 5'-CCGTCCAGATC-CATCGAAGTC-3' 208 pb) (Zijlstra *et al.*, 2000; Randig *et al.*, 2002). Cada PCR se realizó en un volumen final de 30 μ L conteniendo 6.3 μ L de H₂O destilada estéril, 6 μ L de buffer de reacción a una concentración de 5X (Promega), 3 μ L de dNTP's a 10 μ M, 1.5 μ L de MgCl₂ a 25 μ M (Promega) 6 μ L de los primer SCAR correspondientes (10 μ M), 0.2 μ L de *Taq* polimerasa a 5 u/ μ L (Promega) y 1 μ L de ADN de cada población. Adicionalmente se preparó un PCR con ADN de *M. arenaria* y *M. incognita* proporcionado por el Instituto de Ecología, A.C. (INECOL) como control positivo y un PCR sin ADN como control negativo. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de amplificación: 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 64 °C, 1 min a 70 °C; y una extensión final de 8 min a 70 °C (Randig *et al.*, 2002). Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0.02 %) y visualizados bajo luz UV.

La densidad de población de nematodos de diferentes géneros y especies en la misma localidad se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples ($p \leq 0.05$) utilizando el programa STATISTICA 8.0 para Windows.

En los seis sitios de muestreo, las plantas de plátano presentaron síntomas característicos de falta

de *Taq* polimerasa at 5 u/ μ L (Promega) and 1 μ L of DNA of each population. Additionally, a PCR was prepared using *M. arenaria* and *M. incognita* DNA provided by the Instituto de Ecología, A.C. (INECOL) (Ecology Institute, A.C.) as the positive check and a PCR without DNA as the negative check. The PCR was performed in a thermocycler (Applied Biosystems) under the following amplification conditions: 5 min at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 64 °C, 1 min at 70 °C; and a final extension of 8 min at 70 °C (Randig *et al.*, 2002). The amplification products were isolated using the gel electrophoresis method in a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide (0.02 %) and observed under UV light.

The population density of different nematode genera and species from the same location were analyzed using the non-parametric tests Kruskal-Wallis and multiple comparison test ($p \leq 0.05$) using Windows STATISTICA 8.0 software.

At the six sampling sites, banana plants showed symptoms characteristic of lack of nutrients such as rickets (thin stalks), yellowing, water stress and low production or racemes with small bananas. Due to damage to the root system, some plants were found uprooting (Figure 1A), or about to fall over, and showed symptoms of necrosis in most of the roots and some corm areas (Gowen *et al.*, 2005). When the roots were analyzed in the laboratory, reddish lesions in the form of longitudinal lines, as well as necrosis, were observed in the epidermis (Figure 1B); these symptoms were consistent with infestation symptoms caused by nematodes of the genus *Helicotylenchus* (Orion *et al.*, 1999). Swelling and cracking (Figure 1C), as well as female and egg masses of *Meloidogyne* spp. (Figure 1D) were also found.

The identified nematodes were *Criconema* sp., *Helicotylenchus* sp., *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* and

de nutrimentos como raquitismo (tallos delgados), amarillamiento, estrés hídrico y poca producción o racimos con plátanos de menor tamaño. Debido a la afectación del sistema radical, algunas plantas se encontraron volcadas (Figura 1A) o a punto de caer, estas plantas presentaban necrosis en la mayoría de las raíces y en algunas partes del cormo (Gowen *et al.*, 2005). Al examinar las raíces en el laboratorio, se observaron lesiones rojizas en la epidermis en forma de líneas longitudinales y necrosis (Figura 1B), acordes con la sintomatología de nematodos del género *Helicotylenchus* (Orion *et al.*, 1999). Asimismo se encontraron abultamientos y agrietamientos (Figura 1C) y se pudieron observar hembras y masas de huevos correspondientes a *Meloidogyne* spp. (Figura 1D).

Los nematodos identificados fueron: *Cricone-ma* sp., *Helicotylenchus* sp., *Helicotylenchus multincinctus*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis* (Cuadro 1). El PCR utilizando los marcadores SCAR mostró que *M. arenaria* esta presente en cinco localidades y *M. incognita* esta presente en las seis localidades (Figura 2). *M. javanica* y *M. paranaensis* no fueron detectadas en las muestras analizadas. A continuación se hace una descripción de las características morfológicas observadas en los nematodos examinados:

Criconema sp. Hembras: Cutícula ornamentada, 39 a 44 anulaciones de 4-4.8 µm de largo desde la base, redondeadas, levemente dirigidas hacia atrás con una ligera proyección de 2.4-3.2 µm de largo en la parte terminal de cada anulación. De 343 a 571 µm de largo y 46.8 a 62.4 µm de ancho. Dos anulaciones cefálicas diferenciadas del cuerpo, la anulación anterior es mayor que la posterior. Estilete robusto de 70.2-78 µm de largo. Vulva localizada en el último cuarto del cuerpo, en la anulación 33. Labios de la vulva cerrados, de forma cónica

Radopholus similis (Table 1). The PCR performed using SCAR markers showed that *M. arenaria* is present in five localities, while *M. incognita* is present in the six locations (Figure 2). *M. javanica* and *M. paranaensis* were not detected in the analyzed samples. A description of the morphological features of the analyzed nematodes follows:

Criconema sp. Female: Ornamented cuticle, 39 to 44 annulations of 4-4.8 µm long from the base, rounded, slightly directed backwards with a slight projection of 2.4-3.2 µm long at the terminal part of each annulation. From 343 to 571 µm long and 46.8 to 62.4 µm long. Two differentiated cephalic annulations of the body; the former annulation is greater than the latter. Strong stylet 70.2-78 µm long. Vulva located in the last quarter of the body, in annulation 33. The lips of the vulva were closed, cone-shaped and protruded slightly from the contour of the body. Straight vagina, conical to rounded tail (Figure 3A and B).

Helicotylenchus sp. Female: Rolling or arching after having been fixed with formaldehyde, 398 to 671 µm long and 16 a 23 µm wide. Hemispherical labial region and slightly different from the rest of the body; 3 to 4 annulations. Style with prominent basal knobs 16 to 24 µm long. Median esophageal bulb oval-shaped (8 µm wide x 12 µm long) with a small valve apparatus in the center. Esophageal glands overlapping the intestine. Excretory pore near to the junction of the esophagus to the intestine. Well developed vulva, transversally depressed; it is located in the third quarter of the body length. Didelphic, symmetric ovaries and spermathecas (10 to 12 µm diameter). Short tail of the female, semispherical, dorsally convex, with ventral projection (mucron) (Figure 3E). Lateral fields with 4 incisures, around one quarter of the body width.

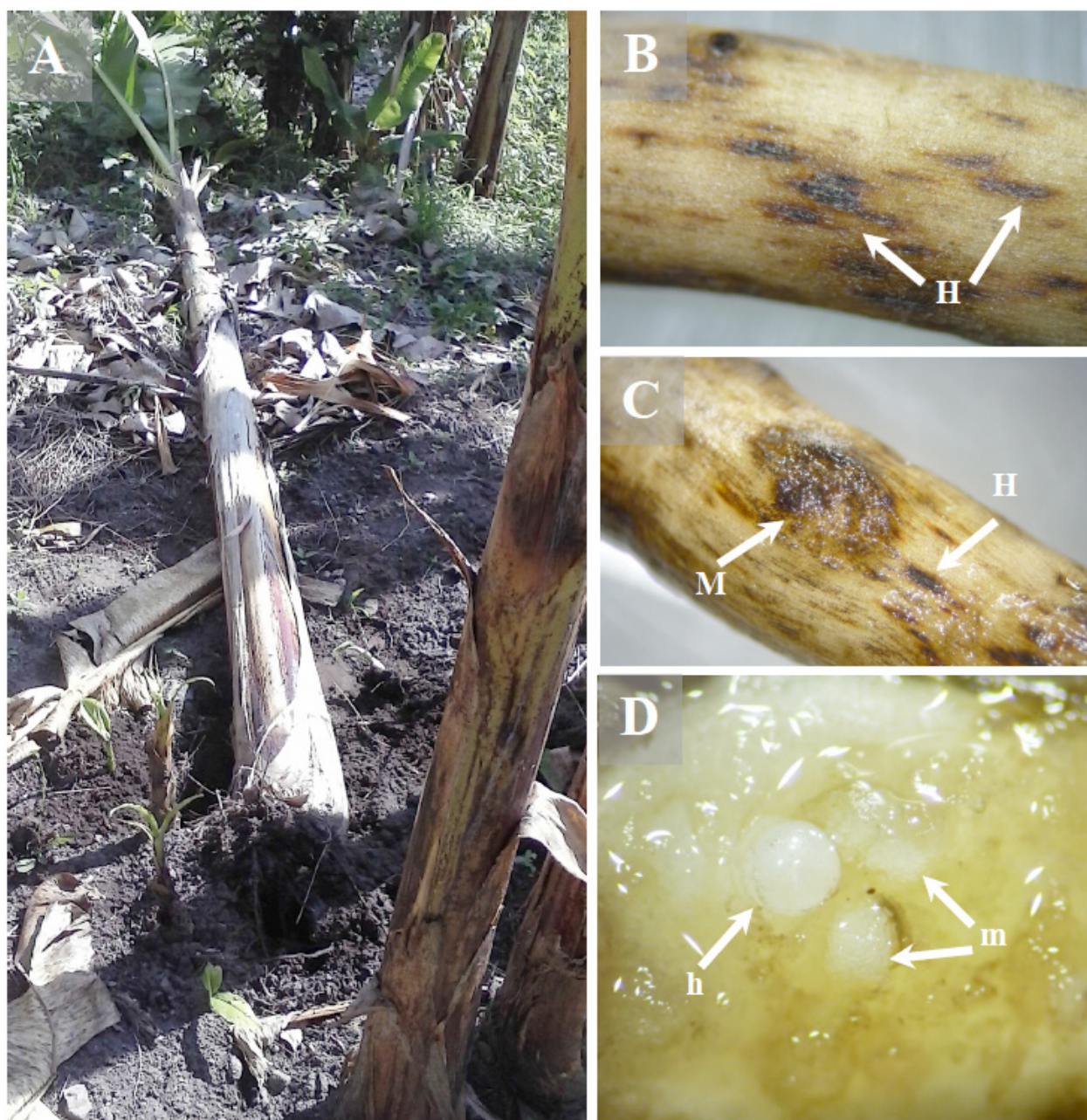


Figura 1. Síntomas de afectación por nematodos en las plantas de plátano A) Planta volcada por debilitamiento de la raíz, B) Lesiones causadas por *Helicotylenchus* spp. (H) en las raíces, C) Abultamiento y agrietamiento de la raíz causado por *Meloidogyne* spp. (M) y lesiones causadas por *Helicotylenchus* spp., D) Hembra (h) y masas de huevos (m) insertadas en las raíces de plátano.

Figure 1. Infestation symptoms caused by nematodes in banana plants A) Toppling and uprooting caused by root weakness, B) Root lesions caused by *Helicotylenchus* spp. (H), C) Root swelling and cracking caused by *Meloidogyne* spp. (M) and lesions caused by *Helicotylenchus* spp., D) Female (h) and egg masses (m) in banana roots.

Cuadro 1. Datos geográficos de los sitios de colecta y especies de nematodos identificados en las plantas de plátano (*Musa acuminata*).

Table 1. Geographical data of the collection sites and nematode species identified in banana plants (*Musa acuminata*).

| Código | Municipio/localidad | Datos geográficos | Cultivo | Diagnóstico |
|--------|------------------------|---|---|--|
| P1 | Atzalan/Cochota | 19°57'22.01"N
97°11'6.01"O
440 msnm | Cultivo de plátano Dominico intercalado con café | <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> |
| P2 | Atzalan/Valle Seco | 19°57'1.97"N
97°11'35.33"O
386 msnm | Monocultivo comercial de plátano Dominico | <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Radopholus similis</i> |
| P3 | Atzalan/El Zapotal | 19°57'59.49"N
97°10'35.83"O
330 msnm | Cultivo de plátano Dominico intercalado con café y cítricos | <i>Criconema</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Radopholus similis</i> |
| P4 | Tlapacoyan/Pochotitan | 19°57'15.39"N
97°13'32.84"O
500 msnm | Cultivo de plátano Dominico intercalado con café y cítricos | <i>Criconema</i> sp., <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Radopholus similis</i> |
| P5 | Tlapacoyan/Platanozapa | 19°57'0.49"N
97°14'2.48"O
820 msnm | Cultivo de plátano Dominico intercalado con café | <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Radopholus similis</i> |
| P6 | Tlapacoyan/Santa Cruz | 19°56'38.43" N
97°12'58.18"O
520 msnm | Cultivo de plátano Dominico intercalado con café | <i>Helicotylenchus</i> sp., <i>Helicotylenchus multicinctus</i> , <i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> |

* *Musa acuminata* AA Sub grupo Pisang Mas localmente llamado Dominico / *Musa acuminata* AA Sub grupo Pisang Mas locally called Dominico.

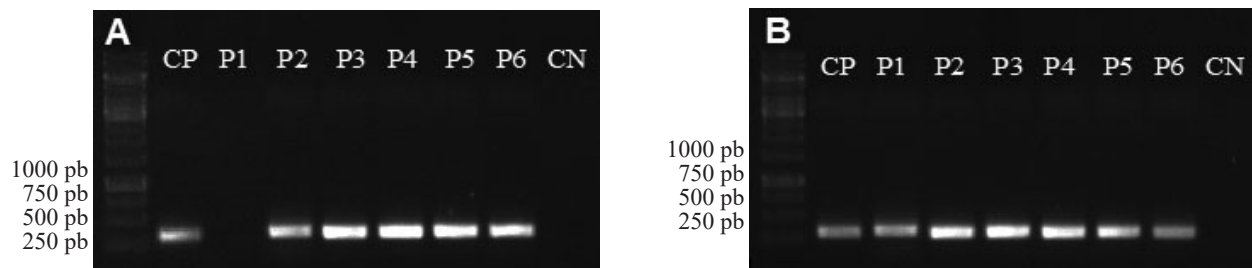


Figura 2. Pruebas de amplificación utilizando el marcador específico para A) *Meloidogyne arenaria* de 420 pares de bases (pb) y B) *M. incognita* de 399 pb en las seis poblaciones provenientes de raíz de *Musa acuminata*. Los números de las poblaciones indican el sitio de muestreo resumido en el cuadro 1. CP= control positivo con ADN de poblaciones de *M. arenaria* y *M. incognita* previamente identificadas. CN= control negativo para el PCR. Las franjas del lado izquierdo son el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb (Thermo Scientific).

Figure 2. Amplification test using specific markers for A) 420 base pairs (pb) of *Meloidogyne arenaria* and B) 399 pb of *M. incognita* in the six populations using roots of *Musa acuminata*. The numbers of the populations suggest the sampling site summarized in Table 1. CP= positive check using DNA of *M. arenaria* and *M. incognita* populations previously identified. CN= negative check for PCR. The stripes on the left correspond to the molecular weight marker GeneRuler 1kb (Thermo Scientific).

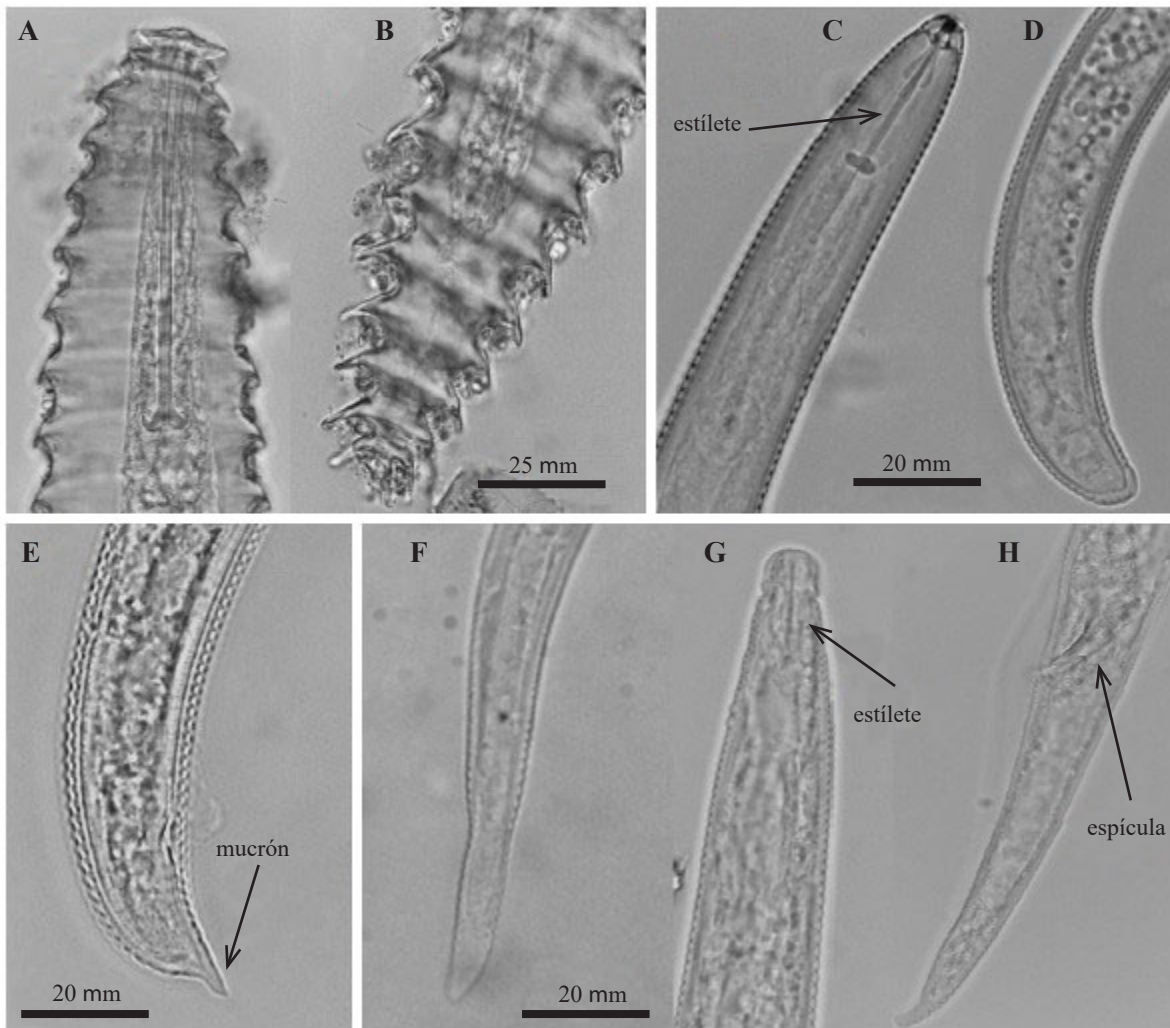


Figura 3. Fotografías al microscopio óptico de algunos especímenes examinados A) Región cefálica de hembra de *Criconema* sp., B) Cauda de hembra de *Criconema* sp., C) Región cefálica de hembra de *Helicotylenchus multinctus*, D) Cauda de hembra de *Helicotylenchus multinctus*, E) Cauda de hembra de *Helicotylenchus* sp. con proyección ventral (mucrón), F) Cauda de hembra de *Radopholus similis*, G) Región cefálica de macho de *Radopholus similis* donde se observa el estilete degenerado, H) Cauda de macho de *Radopholus similis*.

Figure 3. Photographs of some specimens observed under an optical microscope A) Cephalic region of a *Criconema* sp. female, B) Tail of a *Criconema* sp. female, C) Cephalic region of a *Helicotylenchus multinctus* female, D) Tail of a *Helicotylenchus multinctus* female, E) Tail of a *Helicotylenchus* sp. Female with ventral projection (mucrón), F) Tail of a *Radopholus similis* female, G) Cephalic region of a *Radopholus similis* male where a degraded stylet can be seen, H) Tail of a *Radopholus similis* male.

que sobresalen ligeramente del contorno corporal. Vagina recta, cauda conoide a redondeada (Figura 3A y B).

Helicotylenchus sp. Hembras: Enrolladas o ar-

Helicotylenchus multinctus. Female: Arched after having been fixed with formaldehyde, 480 to 640 μm long and 16 to 20 μm wide. Stylet from 20 to 22 μm long with prominent basal knobs (Figure

queadas después de la fijación con formol, 398 a 671 μm de largo y 16 a 23 μm de ancho. Región labial semiesférica ligeramente diferenciada del resto del cuerpo, con 3 a 4 anulaciones. Estilete de 16 a 24 μm de largo con nódulos basales prominentes. Bulbo medio del esófago ovalado (8 μm de ancho por 12 μm de largo) con un pequeño aparato valvular en el centro. Glándula esofágica traslapada con el intestino. Poro excretor cerca de la unión del esófago con el intestino. Vulva bien desarrollada, deprimida trasversalmente, se encuentra en el tercer cuarto con relación a la longitud del cuerpo. Didelfico, ovarios y espermatecas simétricas (10 a 12 μm de diámetro). Cauda de la hembra corta, semiesférica, dorsalmente convexa, con proyección ventral (mucrón) (Figura 3E). Campos laterales con 4 incisuras, aproximadamente una cuarta parte del ancho del cuerpo.

Helicotylenchus multinctus. Hembras: Arqueadas después de la fijación con formol, de 480 a 640 μm de largo y 16 a 20 μm de ancho. Estilete de 20 a 22 μm de largo con nódulos basales prominentes (Figura 3C). Región labial semiesférica con 4 anulaciones. Bulbo medio del esófago ovalado (8 μm de ancho por 10 μm de largo) con un pequeño aparato valvular en el centro. Glándula esofágica traslapada con el extremo frontal del intestino. Poro excretor cerca de la unión del esófago con el intestino. Didelfico, ambas ramas de los órganos reproductores bien desarrolladas y funcionales. Ovarios simétricos, espermatecas redondeadas, con un diámetro de 10 μm . Vulva prominente, ligeramente deprimida trasversalmente, se encuentra en el tercer cuarto con relación a la longitud del cuerpo. Cauda de la hembra corta, semiesférica, dorsalmente convexa, sin proyección ventral o terminal (Figura 3D). Campos laterales con 4 incisuras no areoladas, aproximadamente una cuarta parte del ancho del cuerpo. Machos: de 460 a 686 μm de largo por 16 a 20 μm de ancho. Estilete de 18 a 20 μm de lar-

3C). Semispherical labial region with 4 annulations. Median esophageal bulb oval-shaped (8 μm wide x 10 μm long) with a small valvular apparatus in the center. Esophageal gland overlapping intestine. Excretory pore near to the junction of the esophagus to the intestine. Didelphic, both branches of the reproduction organs well developed and functional. Symmetric ovaries, rounded spermathecas, 10 μm diameter. Vulva prominent, slightly depressed transversally; it is located in the third quarter in relation to the body length. Short tail, semispherical, dorsally convex, without ventral or terminal projection (Figure 3D). Lateral fields with 4 non-areolated incisures, around one quarter of the body width. Male: 460 to 686 μm long x 16 to 20 μm wide. Stylet 18 to 20 μm long. Spicule from 18 to 22 μm long, gubernaculum from 4 to 6 μm . Tail with conical termination and ventral- hyaline projection.

Radopholus similis. Female: Wormlike, 530 to 772 μm long, and 15 to 31 μm wide in the middle. Slightly ringed cuticle. Rounded labial region with 3 to 4 annules. Stylet from 12 to 14 μm long with well-developed basal knobs. Well developed median bulb, oval, from 10 to 12 μm diameter. Well developed valvular apparatus. Esophageal glands overlapping intestine dorsally. Vulva prominent, slightly below in the middle of the body. Didelphic, two functional reproductive organs. Spherical spermathecas. Elongated, cone-shaped tail with an oval-shaped ending (Figure 3F). Lateral fields with 4 non-aerolated incisures. Male: Wormlike slightly ventrally arched, 515 to 632 μm long and 16 to 23 μm wide. Labial region well defined from the rest of the body with 4 or 5 annulations and raised from 4 to 6 μm . Esophagus and stylet degenerated, without visible basal knobs (Figure 3G). Median bulb and valvular apparatus indistinct. Strong spicule from 18 to 20 μm long (Figure 3H). Enlarged gubernaculum from 8 to 10 μm long and pointed at the back end.

go. Espícula de 18 a 22 μm de largo, gubernaculum de 4 a 6 μm . Cola con terminación cónica con una proyección ventral hialina.

Radopholus similis. Hembras: Vermiformes, de 530 a 772 μm de largo y 15 a 31 μm de ancho en la parte media. Cutícula ligeramente anillada. Región labial redondeada de 3 a 4 anulaciones. Estilete de 12 a 14 μm de largo con nódulos basales bien desarrollados. Bulbo medio bien desarrollado, ovalado de 10 a 12 μm de diámetro. Aparato valvular bien desarrollado. Glándulas esofágicas traslapadas dorsalmente sobre el intestino. Vulva prominente, ligeramente debajo de la mitad del cuerpo. Didélfico, dos órganos reproductores funcionales. Espermatecas esféricas. Cola en forma de cono elongado con terminación ovalada (Figura 3F). Campos laterales con 4 incisuras no areolados. Macho: Vermiformes ligeramente arqueado ventralmente, de 515 a 632 μm de largo y 16 a 23 μm de ancho. Región labial bien definida del resto del cuerpo con 4 o 5 anulaciones y elevada de 4 a 6 μm . Esófago y estilete degenerado sin nódulos basales visibles (Figura 3G). No se logran apreciar el bulbo medio y aparato valvular. Espícula fuerte de 18 a 20 μm de largo (Fig. 3H). Gubernáculo alargado de 8 a 10 μm de largo afilado en la parte anterior.

Meloidogyne arenaria. Hembra: Blanca, cuerpo en forma de pera, 510-1000 μm de largo y 400-600 μm de ancho. Cuello con forma cónica. Estilete robusto, 14 - 16 μm de largo. Orificio de la glándula dorsal esofágica en la base del estilete. El patrón perineal tiene un arco dorsal bajo y redondeado, comprimido dorso-lateralmente, con estrías separadas, onduladas y lisas (Figura 4A).

Meloidogyne incognita. Hembra: Blanca, cuerpo esférico de cuello corto de 500 a 723 μm de largo y 331 a 520 μm de ancho. Estilete de 12 a 15 μm de largo. Vulva con forma alargada, orientada transversalmente en el centro del cuerpo. El patrón perineal presenta forma de pera con un arco dorsal alto

Meloidogyne arenaria. Female: White, pear-shaped body, 510-1000 μm long and 400-600 μm wide. Conical neck. A strong 14 to 16 μm long stylet. Dorsal esophageal gland opening at the base of the stylet. The perineal pattern has a depressed and rounded dorsal arch, dorsal-laterally compressed, with undulated and smooth separated marks. (Figure 4A).

Meloidogyne incognita. Female: White, spherical body with 500 to 723 μm long short neck and 331 to 520 μm wide. A 12 to 15 μm long stylet. Elongated vulva transversally oriented at the center of the body. Pear-shaped perineal pattern with a high and trapezoidal arch formed by closely-spaced marks, relatively thick, smooth, and slightly undulated or in zigzag (Figure 4B).

The nematode genera found are similar to the ones reported in *Musa* spp. plants in different countries, though the number of species found was low compared to those found in other studies (Kamira *et al.*, 2013; Chitamba *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013). Also, *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. and *Radopholus similis* found in banana correspond to genera previously reported in Mexico (Montes-Belmont, 2000; Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001; Adriano-Anaya *et al.*, 2008; López-Lima *et al.*, 2015). This is the first time *Criconeema* sp., *Helicotylenchus multicinctus*, *M. arenaria* and *Radopholus similis* have been reported in banana crops in Veracruz. *Helicotylenchus microcephalus*, *Meloidogyne incognita*, *M. paranaensis* and *Tylenchus* spp. (Montes-Belmont 2000; López-Lima *et al.*, 2015) were reported in previous studies.

Helicotylenchus sp. and *Helicotylenchus multicinctus* were present in all the sampling sites and were the most abundant (Table 2). These nematode genera, in particular *H. multicinctus* and *H. dihystra* species, are considered a strong constraint for banana crops worldwide (Das *et al.*, 2014), though *H. dihystra* was not found in this

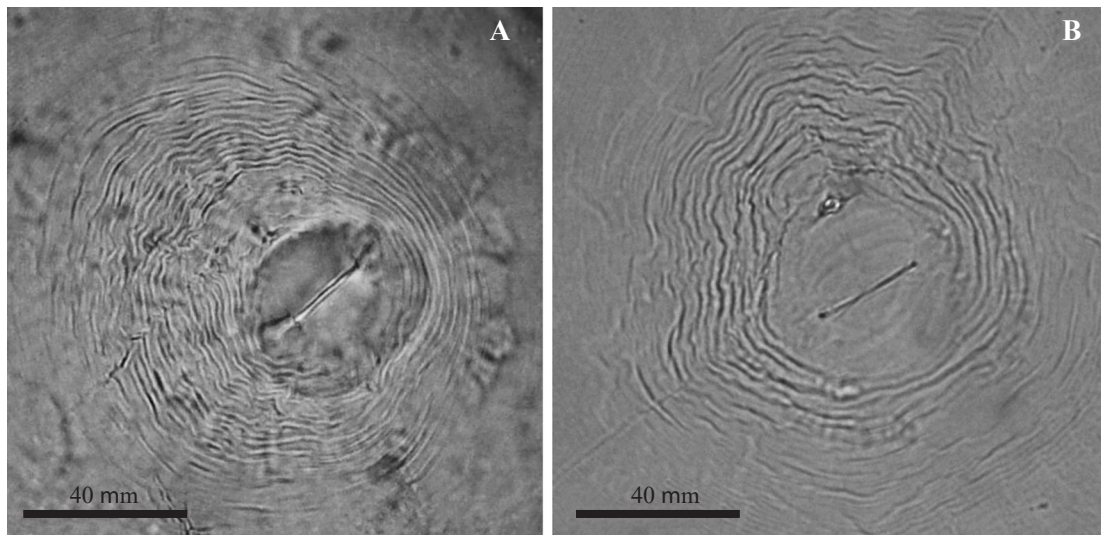


Figura 4. Fotografías al microscopio óptico de los patrones perineales de las hembras de *Meloidogyne* spp., A) *M. arenaria*, B) *M. incognita*.

Figure 4. Photographs of perineal patterns of *Meloidogyne* spp., A) *M. arenaria*, B) *M. incognita* females.

y trapezoidal, formado por estrías poco espaciadas, relativamente gruesas, lisas, levemente onduladas o en forma de zig-zag (Figura 4B).

Los géneros de nematodos encontrados coinciden con los registrados en plantas de *Musa* spp. en diversos países, aunque el número de especies encontradas es bajo en comparación con otros estudios (Kamira *et al.*, 2013; Chitamba *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013). Asimismo, la identificación de *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. y *Radopholus similis* sobre plátano coinciden con lo reportado anteriormente para México (Montes-Belmont, 2000; Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001; Adriano-Anaya *et al.*, 2008; López-Lima *et al.*, 2015). Es el primer registro de *Criconea* sp., *Helicotylenchus multicinctus*, *M. arenaria* y *Radopholus similis* en el cultivo de plátano en Veracruz. En trabajos anteriores se registró a *Helicotylenchus microcephalus*, *Meloidogyne incognita*, *M. paranaensis* y *Tylenchus* spp. (Montes-Belmont 2000; López-Lima *et*

study. The two species of root-knot (galling of the root) nematodes found in this study are the most widely distributed in banana crops (Cofcewicz *et al.*, 2005). Recently, *M. incognita* was detected in banana root associated with *M. paranaensis* in a location near the study area in the municipality of Atzalan (López-Lima *et al.*, 2015). However, during the PCR test no amplification of this species was detected. The presence of *Helicotylenchus multicinctus* populations associated with *M. arenaria* and *M. incognita* populations may represent a risk for banana production in this area, as it has happened in other sites where the two nematode genera have caused serious damages to banana crops (Brentu *et al.*, 2004; Subbotin *et al.*, 2011).

The most harmful and widely distributed plant parasitic nematode in banana roots is *Radopholus similis* (Chabrier and Queneherve, 2003; Quénéhervé *et al.*, 2011), which was found

al., 2015).

En todos los sitios de muestreo se encontraron a *Helicotylenchus* sp. y *Helicotylenchus multicinctus*, los cuales fueron los más abundantes (Cuadro 2). Este género de nematodo, en particular las especies *H. multicinctus* y *H. dihystra* se consideran una fuerte limitante para el cultivo de plátano en diversas partes del mundo (Das *et al.*, 2014), aunque *H. dihystra* no se encontró en este estudio. Las dos especies de nematodos agalladores encontradas en este estudio son las más distribuidas en los cultivos de plátano (Cofcewicz *et al.*, 2005). Recientemente *M. incognita* fue registrada en raíces de plátano en asociación a *M. paranaensis* en una localidad cercana a la zona de estudio en el municipio de Atzalan (López-Lima *et al.*, 2015), sin embargo en el PCR no se detectó amplificación para esta especie. La presencia de poblaciones de *Helicotylenchus multicinctus* en asociación con poblaciones de *M. arenaria* y *M. incognita* pueden representar un riesgo para la producción del plátano en esta zona,

in four out of six of the study sites, though in small populations. This may be due to the origin and variety of banana plants in this area (*Musa acuminata* AA subgroup Pisang Mas). This statement is based on the findings that show that many diploid accessions, such as the studied plants, are less susceptible to *R. similis* (Quénéhervé *et al.*, 2009). Also, the temperature rank in the study area (14-26 °C) is low for the optimal development of *R. similis* (24-32 °C) (Pinochet *et al.*, 1995; Gowen *et al.*, 2005) and can contribute to a higher presence of *Helicotylenchus* and *Meloidogyne*. In the production area of Chiapas, Mexico, *R. similis* has been reported to be the dominant nematode over *Musa* AAA from the Cavendish subgroup (Adriano-Anaya *et al.*, 2008).

The population density of endoparasitic nematodes found in roots was relatively low (Table 2) compared to those reported in other studies conducted in the state of Chiapas, which have found densities of more than 10,000 individuals

Cuadro 2. Número de nematodos fitoparásitos encontrados en 100 g de raíz ± desviación estandar.

Table 2. Number of plant parasitic nematodes found in 100 g of root tissue ± standard deviation.

| Municipio/localidad | <i>Criconea</i> sp. | <i>Helicotylenchus</i> sp. | <i>Helicotylenchus multicinctus</i> | J2 <i>Meloidogyne</i> spp. | <i>Radopholus similis</i> | Total | Estadístico [§] |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------|--------------------------|
| Atzalan/Cochota | -- | 428±238a | 81±133b | 80±85ab | -- | 589 | H=7.44
p= 0.02 |
| Atzalan/Valle Seco | -- | 140±84a | 10±1b | 50±4ab | 14±11b | 214 | H=15.05
p=0.001 |
| Atzalan/El Zapotal | 1±1c | 890±80a | 369±311ab | 629±674ab | 6±6bc | 1,895 | H=18.84
p=0.0008 |
| Tlapacoyan/Pochotitan | 1±1b | 355±323a | 30±24ab | 23±29ab | 40±48ab | 449 | H=16.38
p= 0.002 |
| Tlapacoyan/Platanozapan | -- | 167±183 | 72±90 | 18±23 | 15±27 | 272 | H=6.34
p= 0.09 |
| Tlapacoyan/Santa Cruz | -- | 98±84a | 17±14ab | 11±12b | -- | 126 | H=6.77
p= 0.03 |

Los valores representan el promedio de cinco muestras en cada sitio de colecta. §= Prueba de Kruskal-Wallis (H). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre géneros y especies de nematodos con la prueba de comparaciones múltiples (p≤0.05) / Values represent the average of five samples at each collection site. §=Kruskal-Wallis (H). Different letters in columns indicate significant differences between genera and species of nematodes with multiple comparisons test (p≤0.05).

como ha ocurrido en otros lugares donde estos dos géneros de nematodos causa fuertes daños al cultivo (Brentu *et al.*, 2004; Subbotin *et al.*, 2011).

El nematodo parásito más perjudicial y distribuido en el mundo en raíces de plátano es *Radopholus similis* (Chabrier y Queneherve, 2003; Quénéhervé *et al.*, 2011), este se encontró en cuatro de los seis sitios examinados, aunque en bajas poblaciones, esto puede deberse al origen y la variedad de las plantas cultivadas en esta zona (*Musa acuminata* AA subgrupo Pisang Mas) ya que se ha demostrado que muchas accesiones diploides como las plantas estudiadas en este trabajo, son menos susceptibles a *R. similis* (Quénéhervé *et al.*, 2009). Asimismo el rango de temperaturas de la zona de estudio (14-26 °C) es bajo para el óptimo desarrollo de *R. similis* (24-32 °C) (Pinochet *et al.*, 1995; Gowen *et al.*, 2005) lo que puede influir en la mayor presencia de *Helicotylenchus* y *Meloidogyne*. En la zona de producción en Chiapas, México *R. similis* se ha registrado como el nematodo dominante sobre *Musa* AAA del sub grupo Cavendish (Adriano-Anaya *et al.*, 2008).

La densidad de población de los nematodos endoparásitos encontrados en las raíces fue relativamente baja (Cuadro 2) en comparación con otros estudios realizados en el estado de Chiapas donde han alcanzado densidades mayores a 10,000 individuos en 100 g de raíz (Adriano-Anaya *et al.*, 2008). Los pocos ejemplares encontrados de *Criconema* sp., puede deberse a que es un nematodo ectoparasito, por lo que su ciclo de vida se desarrolla fuera de la raíz (Yeates *et al.*, 1993). Las especies de *Helicotylenchus* fueron las más abundantes en todos los sitios de estudio y su población fue significamente mayor a la población de *Radopholus similis* debido, a que su población fue baja en las cuatro localidades donde se encontró. La densidad de población de J2 de *Meloidogyne* spp. fue baja en todas las localidades con excepción de El Zapo-

in 100 g of roots (Adriano-Anaya *et al.*, 2008). The reason that few *Criconema* sp. nematodes were found could be that they are ectoparasitic nematodes whose life cycle takes place outside of the root (Yeates *et al.*, 1993). The *Helicotylenchus* species were the most abundant in all the study sites and their population was significantly higher than the *Radopholus similis* population it was lower in the four locations where it was found. The population density of *Meloidogyne* spp. J2 was low in all locations except El Zapotal, where the highest total number of nematodes was found. This could be because El Zapotal is located at the lowest altitude over sea level and weather conditions there may be more favorable for nematode reproduction. However, it is necessary to conduct studies on various aspects related to population dynamics and its influence on production.

Symptoms observed in the banana plants from the municipalities of Atzalan and Tlapacoyan are caused by plant parasitic nematodes, which are reported for the first time in the main production area in the state of Veracruz. Genera of nematodes causing the greatest damage worldwide were recorded. The information from this study is instrumental to implement control measures and prevent the spread of these plant parasitic nematodes to other areas, since banana spreading takes places through vegetative propagation. It is necessary to conduct studies to quantify the economic damage caused by these nematodes to banana crops, including studies at the field level to test control strategies.

Acknowledgements.

This study is part of the outputs of the project 000174936 funded by CONACYT and the Secretariat of Economy. We would like to thank Bertha Pérez Hernández for her advice on molecular techniques. Finally, thanks to the banana producers who allowed us to take samples from their plantations.

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

tal. En esta localidad se encontró el mayor número de nematodos totales, esto podría deberse a que es la localidad ubicada a menor altitud sobre el nivel del mar, y las condiciones climáticas podrían ser más favorables para su reproducción. Sin embargo es necesario realizar estudios sobre varios aspectos relacionados a la dinámica poblacional y su influencia en la producción.

Los síntomas observados en las plantas de plátano estudiadas de los municipios de Atzacan y Tlapacoyan son causados por nematodos fitoparásitos, los cuales se reportan por primera vez en la principal zona de producción de este cultivo en el Estado de Veracruz. Se registraron los géneros de nematodos que a nivel mundial causan los mayores daños al cultivo. La información generada en este trabajo es básica para iniciar acciones de control y evitar la dispersión de estos fitoparásitos a otras áreas, ya que la propagación del plátano se hace de manera vegetativa. Es necesario realizar estudios donde se cuantifique el daño económico causado por estos nematodos al cultivo de plátano, y donde se realicen estudios a nivel de campo para probar estrategias de control.

#### Agradecimientos

Este estudio es parte de los resultados del proyecto 000174936 financiado por el Fondo Sectorial de Innovación (FINNOVA) del CONACyT y la Secretaría de Economía. Agradecemos a Bertha Pérez Hernández por su asesoramiento en las realización de las técnicas moleculares. Por último agradecemos a los productores de plátano que permitieron tomar las muestras en sus plantaciones.

## LITERATURA CITADA

Adriano-Anaya ML, Herrera-López D, Albores-Flores V, Salvador-Figueroa M y Velasco-Zebadua ME. 2008. Nematodos endorrizosféricos del banano (*Musa* AAA sub grupo Cavendish) clon "grande naine" en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:147-152.

Disponible en línea:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61226207>

- Brentu CF, Speijer PR, Green KR, Hemeng BMS, De Waele D and Coyne DL. 2004. Micro-plot evaluation of the yield reduction potential of *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* and *Meloidogyne javanica* on plantain cv. Apantu-pa (*Musa* spp., AAB-group) in Ghana. *Nematology*. <http://dx.doi.org/10.1163/1568541042360537>
- Carneiro RMDG, Tigano MS, Randing O, Almeida MRA and Sarah JL. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 2:287-298. <http://dx.doi.org/10.1163/1568541041217942>
- Carneiro RMDG and Cofcewicz E. 2008. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Pp: 87-122. In: Souza R. (ed.). *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Springer. Netherlands. 340p. Disponible en línea: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8720-2\\_6](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8720-2_6)
- Cofcewicz ET, Carneiro RMDG, Randig O, Chabrier C and Quénéhervé P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on *Musa* in Martinique, Guadalupe, and French Guiana. *Journal of Nematology* 3:313-322. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620976/>
- Chabrier C and Quénéhervé P. 2003. Control of the burrowing nematode (*Radopholus similis* Coob) on banana: impact of the banana field destruction method on the efficiency of the following fallow. *Crop Protection*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00121-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00121-7)
- Chitamba J, Manjeru P, Chinheya CC, Mudada N and Handiseni M. 2013. Plant-parasitic nematodes associated with banana (*Musa* spp.) in Rusitu Valley, Zimbabwe. *Nematropica* 43:113-118. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/82440>
- Cid del Prado-Vera I, Tovar-Soto A y Hernández JA. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 1:32-39. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219105>
- Das SC, Balamohan TN, Poornima K, Velalazan R and Seenivasan N. 2014. Breeding and evaluation of *Musa* hybrids to the spiral nematode, *Helicotylenchus multicinctus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. <http://dx.doi.org/10.5958/j.0975-6906.74.1.008>
- Gowen SR, Quénéhervé P, and Fogain R. 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. Pp: 611-643. In: Luc M, Sikora RA, and Bridge J. (eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International. UK. 917p.
- Kamira M, Hauser S, van Asten P, Coyne D and Talwana HL. 2013. Plant parasitic nematodes associated with banana and plantain in eastern and western Democratic Republic of Congo. *Nematropica* 2:215-225. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/82710>
- Lima RS, Muniz MFS, Castro JMC, Oliveira ERL, Oliveira PG, Siqueira KMS, Machado ACZ and Costa JG. 2013. Frequencies and population densities of the major phytonematodes associated with banana in the state of Alagoas, Brazil. *Nematropica* 43:186-193. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/82707>
- López-Lima D, Sánchez-Nava P, Carrion G, Espinosa de los

- Monteros A and Villain L. 2015. Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology*.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0564-9>
- Montes-Belmont R. 2000. *Nematología vegetal en México*. Segunda edición. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. 158p.
- Orion D, Levy Y, Israeli Y and Fischer E. 1999. Scanning electron microscope observations on spiral nematode (*Helicotylenchus multicinctus*) infested banana roots. *Nematropica* 29:179-183. Disponible en línea:  
<http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64247>
- Orton-Williams KJ. 1973. *Meloidogyne incognita*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic nematodes, Set 2 No. 18.
- Orton-Williams KJ. 1975. *Meloidogyne arenaria*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic nematodes, Set 5 No. 62.
- Orton-Williams KJ and Siddiqi MR. 1973. *Radopholus similis*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic nematodes, Set 2 No. 27.
- Pinochet J, Fernandez C and Sarah JL. 1995. Influence of temperature on in vitro reproduction of *Pratylenchus coffeae*, *P. goodeyi*, and *Radopholus similis*. *Fundamental and Applied Nematology* 18:391-392.
- Quénéhervé P, Valette C, Topart P, Tezenas-du Montcel H and Salmon F. 2009. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica*.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-008-9773-7>
- Quénéhervé P, Barrière V, Salmon F, Houdin F, Achard R, Gertrude JC, Marie-Luce S, Chabrier C, Duyck PF and Tixier P. 2011. Effect of banana crop mixtures on the plant-feeding nematode community. *Applied Soil Ecology*.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.003>
- Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG and Castagnone-Sereno P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*.  
<http://dx.doi.org/10.1139%2Fg02-054>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2014) Producción Nacional de plátano. Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Siddiqi MR. 1973. *Helicotylenchus multicinctus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic nematodes, Set 2 No. 23.
- Siddiqi MR. 2000. *Tylenchida: Parasites of Plants and Insects*. CAB International. United Kingdom 848p.
- Seinhorst JW. 1962. On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*.  
<http://dx.doi.org/10.1163/187529262X00981>
- Subbotin SA, Inserra RN, Marais M, Mullin P, Powers TO, Roberts PA, Van Den Berg E, Yeates GW and Baldwin JG. 2011. Diversity and phylogenetic relationships within the spiral nematodes of *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Tylenchida: Hoplolaimidae) as inferred from analysis of the D2-D3 expansion segments of 285 rRNA gene sequences. *Nematology*. <http://dx.doi.org/10.1163/138855410X520936>
- van Bezooijen J. 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen University, The Netherlands. 112p. Disponible en línea: <https://www.wageningenur.nl/en/show/Manual-Methods-and-Techniques-for-nematology-1.htm>
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW, and Georgieva SS. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera—an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25:315-331. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619405/>
- Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*.  
<http://dx.doi.org/10.1163/156854100750112798>